

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Injuria térmica del nucleóide de Escherichia Coli y su  
reparación in vivo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**José Ramón Pellon Olagorta**

DIRECTOR:

**Bernabé Sanz Pérez**

**Madrid, 2015**

José Ramón Pellón Olagorta

TP  
1980  
111



x-53-08-1774-2

**INJURIA TERMICA DEL NUCLEOIDE DE ESCHERICHIA**  
**COLI Y SU REPARACION IN VIVO**

Departamento de Higiene y tecnología de los Alimentos  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Complutense de Madrid  
1980



LIBRERIA

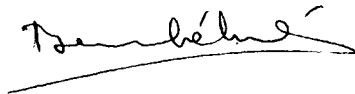
© José Ramón Pellón Olagorta  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1980  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-25378-1980

Bernabé Sanz Pérez, Catedrático de Bromatología y  
Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Veteri-  
naria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICO:

Que la tesis titulada "INJURIA TERMICA DEL  
NUCLEOIDE DE ESCHERICHIA COLI Y SU REPARACION  
IN VIVO de la que es autor Don José Ramón Pe-  
llón Olagorta, ha sido realizada bajo mi direc-  
ción y cumple las condiciones exigidas para  
optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid a veintiuno de marzo de mil novecien-  
tos ochenta.



JOSE RAMON PELLON OLAGORTA

INJURIA TERMICA DEL NUCLEOIDE DE ESCHERICHIA COLI  
Y SU REPARACION IN VIVO.

Director: Prof. Dr. Bernabé Sanz Pérez  
Catedrático de Bromatología y  
Microbiología de los alimentos.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE HIGIENE Y MICRO-  
BIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

1980

## AGRADECIMIENTO

Deseo agradecer al Prof. Dr. Bernabé Sanz Perez su inestimable ayuda en momentos en los que yo mismo dudaba de poder seguir dedicándome "a la investigación". Tanto personal como científicamente, Don Bernabé siempre me dió su sincero consejo. Asimismo, al Prof. Dr. Pascual Lopez Lorenzo le agradezco su visión de futuro y su ayuda en diversas ocasiones.

El Dr. Reinaldo Gómez merece especial mención ya que fué él el que me sugirió este tema de tesis y el que me indicó como solucionar algunos de los problemas teóricos y prácticos que se me han presentado. Rey ha sido en los últimos años profesor y amigo, por lo que le quedo agradecido.

En el aspecto económico, una beca del Instituto Tecnológico para Postgraduados (ITP) me ha permitido terminar esta tesis y ampliar mis conocimientos en el Instituto Tecnológico de Massachusetts.

Finalmente, quiero dedicar esta tesis a mi madre que, sin entender los experimentos que aquí se describen, es la persona que más se ha alegrado de su terminación.

INDICE

	<u>Página</u>
Título. . . . .	i
Agradecimiento. . . . .	ii
Indice General. . . . .	iii
Indice de Figuras . . . . .	v
Indice de Tablas. . . . .	vii
I. Introducción . . . . .	1
II. Revisión bibliográfica . . . . .	3
A. Daño térmico y su reparación . . . . .	3
1. Definición de términos e importancia de la injuria térmica. . . . .	3
2. Daño térmico a las proteínas . . . . .	6
3. Daño térmico en la pared celular y en la membrana exterior. . . . .	7
4. Daño térmico en la membrana citoplásmica . . . . .	7
5. Daño térmico en los ribosomas. . . . .	9
6. Daño térmico del cromosoma . . . . .	11
7. Reparación del daño térmico. . . . .	15
B. El cromosoma plegado ó nucleóide del <u>Escherichia coli</u> . . . . .	20
1. Aislamiento, composición y propiedades . . . . .	20
2. Efecto de la velocidad de centrifugación en el coeficiente de sedimentación del nucleóide . . . . .	27
3. Superarrollamiento y organización del DNA en el nucleóide . . . . .	30
4. Efectos del calor en el nucleóide. . . . .	33
III. Materiales y Métodos . . . . .	38
A. Productos químicos . . . . .	38
1. Generales. . . . .	38
2. Material radioactivo . . . . .	38
3. Enzimas. . . . .	38
B. Microorganismos. . . . .	39
C. Medios microbiológicos y soluciones tampón . . . . .	39
D. Condiciones de cultivo del microorganismo. . . . .	41
E. Marcaje radioactivo de los cultivos. . . . .	41

INDICE (continuación)

	<u>Página</u>
F. Tratamiento térmico . . . . .	42
G. Aislamiento de los cromosomas plegados o nucleoides. . . . .	43
H. Centrifugación en gradientes de sacarosa . . . . .	44
IV. Resultados. . . . .	47
A. Daño térmico. . . . .	47
1. Curva de supervivencia. . . . .	47
2. Nucleoides tratados termicamente <u>in vivo</u> . . . . .	47
B. Propiedades de los nucleoides tratados termicamente in vivo . . . . .	64
C. Reparación despues del daño térmico , . . . . .	78
1. Demostración de la injuria térmica y su reparación. . . . .	78
2. Daño térmico y su reparación despues de períodos cortos de calentamiento. . . . .	103
V. Discusión . . . . .	121
A. Daño térmico. . . . .	121
B. Reparación despues del daño térmico . . . . .	131
VI. Conclusiones. . . . .	142
VII. Bibliografía. . . . .	145



### FIGURAS

<u>Número</u>	<u>Título</u>	<u>Página</u>
1	Resultados hipotéticos que demuestran la injuria de los microorganismos y su posterior reparación . . .	5
2	Modelo de la organización del DNA en el nucleóide de <u>Escherichia coli</u> . . . . .	34
3	Curva de supervivencia de <u>Escherichia coli</u> K-12 despues del tratamiento térmico. . . . .	48
4	Perfiles de sedimentación de los nucleóides procedentes de células calentadas (0-10 min. a 50°C) sin enfriamiento posterior a 0°C . . . . .	50
5	Perfiles de sedimentación de los nucleóides procedentes de células calentadas (0-10 min. a 50°C) y posteriormente enfriadas a 0°C . . . . .	54
6	Perfiles de sedimentación de los nucleóides procedentes de células calentadas (15-60 min. a 50°C) . . .	57
7	Perfiles de sedimentación de los nucleóides procedentes de células calentadas (15-60 min. a 50°C) . . .	60
8	Perfil de sedimentación de los nucleóides procedentes de células calentadas a 50°C durante 120 min . . .	62
9	Perfiles de sedimentación de los nucleóides asociados con membrana, libres, y procedentes de células calentadas . . . . .	65
10	Comparación de los perfiles de sedimentación de DNA y proteína entre los nucleóides libres de membrana celular y asociados a la misma y los nucleóides de celulas calentadas . . . . .	67
11	Perfiles de sedimentación de los nucleóides sin calentar, nucleóides calentados y con proteína asociada y nucleóides calentados y asociados con la membrana. Centrifugación a 3700 rpm. . . . .	71
12	Perfiles de sedimentación de los nucleóides calentados y con proteína asociada y nucleóides calentados y asociados con membrana. Centrifugación a 3000 rpm . . . . .	73
13	Perfiles de sedimentación de los nucleóides calentados sometidos a distintas velocidades de centrifugación . . . . .	76

## FIGURAS (continuación)

<u>Número</u>	<u>Título</u>	<u>Página</u>
14	Perfiles de sedimentación de los nucleoides obtenidos al lisar simultáneamente células calentadas y sin calentar. . . . .	79
15	Injuria térmica y su reparación. . . . .	81
16	Injuria térmica y su reparación despues de un calentamiento térmico a 50°C durante 30 min . . . . .	84
17	Perfiles de sedimentación de los nucleoides procedentes de las células sufriendo injuria térmica (50°C, 30 min) y su reparación . . . . .	86
18	Injuria térmica y su reparación despues de un tratamiento térmico a 50°C durante 120 min. . . . .	92
19	Perfiles de sedimentación de los nucleoides procedentes de células sufriendo injuria térmica (50°C, 120 min) y su reparación . . . . .	94
20	Injuria térmica y su reparación despues de un tratamiento térmico a 52°C durante 40 minutos . . . . .	98
21	Perfiles de sedimentación de los nucleoides procedentes de celulas sufriendo injuria térmica (52°C, 40 min) y su reparación . . . . .	100
22	Injuria térmica y su reparación despues de un tratamiento térmico a 50°C durante 5 min. . . . .	104
23	Perfiles de sedimentación de los nucleoides procedentes de células sufriendo injuria térmica (50°C, 4 min) y su reparación . . . . .	106
24	Perfiles de sedimentación de los nucleoides procedentes de células sufriendo injuria térmica (50°C, 3 min) y su reparación . . . . .	111
25	Perfiles de sedimentación de los nucleoides procedentes de células sufriendo injuria térmica (50°C, 5 min) y su reparación . . . . .	113
26	Perfiles de sedimentación de los nucleoides procedentes de células normales y sufriendo injuria térmica (50°C, 4 min) y su reparación con y sin rifampicina. . . . .	116

TABLAS

<u>Número</u>	<u>Título</u>	<u>Página</u>
I	<u>Escherichia coli</u> : componentes y propiedades de sus nucleoides . . . . .	28
II	Características del <u>E. coli K-12, KU 105</u> . . . . .	40
III	Cocientes leucina/timidina en los nucleoides de células calentadas y sin calentar . . . . .	70
IV	Cocientes leucina/timidina en los nucleoides de las células que están sufriendo la injuria térmica y su posterior reparación . . . . .	91
V	Dependencia del coeficiente de sedimentación en la velocidad de centrifugación . . . . .	130
VI	Porcentajes de <sup>3</sup> H-leucina que se recuperan en las fracciones 10-27 de los gradientes. . . . .	135
VII	Efecto de la reparación celular en la viabilidad y en la integridad de los nucleoides. . . . .	140



## I. INTRODUCCION

El daño térmico produce en las células bacterianas gran variedad de cambios estructurales y funcionales. La injuria térmica de los microorganismos constituye una respuesta, catalizada por el calor, que se manifiesta en una diferencia en el número de células viables que se desarrollan en dos o más medios de recuento distintos (Gómez, 1977). Se supone que la injuria térmica precede a la muerte térmica.

Para poder determinar cuáles son los tipos de daño térmico celular que se necesitan reparar antes de la reiniciación del crecimiento y división celular, se debe establecer la importancia relativa de las alteraciones estructurales y funcionales que ocurren durante la injuria térmica y su reparación.

La integridad funcional de una célula bacteriana depende en sobremanera del mantenimiento de la integridad estructural y funcional de su DNA. El nucleóide o cromosoma plegado de Escherichia coli es una estructura particulada que, según se piensa hoy, es similar al cromosoma tal y como éste se encuentra in vivo. El nucleóide comprende la totalidad del DNA celular junto con RNA y proteína formando una estructura compacta (Pettijohn, 1976) y los cambios que esta estructura sufre quedan reflejados en variaciones de sus propiedades de sedimentación. La dependencia del coeficiente de sedimentación del nucleóide en la velocidad de centrifugación ha demostrado ser una herramienta útil a la hora de examinar los cambios estructurales (Hecht et al. 1977).

La influencia que el daño térmico ejerce en el nucleóide no

ha sido estudiada hasta la fecha. Esta tesis tiene como propósito fundamental el investigar los cambios que el nucleóide de Escherichia coli sufre durante el daño térmico, su reparación, y la relación del daño del nucleóide con la viabilidad celular en cultivos en placas.

## II. REVISION BIBLIOGRAFICA

### A. DAÑO TERMICO Y SU REPARACION

#### 1. Definición de términos e importancia de la injuria térmica.

La muerte o inactivación bacteriana ha sido definida como "el cese en la división celular con la consiguiente ausencia de colonias visibles en placas de un medio nutritivo" (Gómez, 1977). La metodología que se ha empleado al estudiar los mecanismos de inactivación térmica ha consistido en determinar las alteraciones que el calor produce en los diferentes componentes celulares (proteínas, DNA, RNA y membrana) y establecer su relación con la viabilidad celular.

Al tratar de delimitar un umbral para la inactivación térmica de las células, nos encontramos con una bibliografía que demuestra que la inactivación celular no es un proceso que responda a la ley del todo o nada sino que dependiendo de diversas condiciones ambientales una misma bacteria puede morir ó recuperarse del daño térmico y empezar a crecer y dividirse de nuevo.

Injuria térmica en microorganismos es un término que "se usa para describir una respuesta catalizada por el calor y que se manifiesta como una diferencia en el número de colonias (células viables) que se obtienen en dos o más medio nutritivos de diferente composición" (Gómez, 1977). Cierta número de células serian capaces de reparar el daño térmico bajo las condiciones de un cierto medio pero no lo serian y aparecerian como muertas o inactivas en otro. Se dá por sentado que la injuria térmica es el fenómeno precursor

de la muerte o inactivación por el calor. Resultados hipotéticos que demuestran la injuria térmica y su posterior reparación se incluyen en la Figura 1.

La injuria térmica de diferentes especies microbianas ha sido claramente establecida, entre otras, en: Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Aerobacter aerogenes, Pseudomonas fluorescens, Vibrio marinus, Bacillus subtilis, Clostridium botulinum y Candida utilis (Busta, 1976).

El grado de injuria térmica puede variar si se combina con otros agentes como: congelación y descongelación, liofilización, reducción de la humedad, medio nutritivo, irradiación, adición de conservadores acidulantes, etc. (Busta, 1976). Las características físicas y químicas del medio en el cual las bacterias se reparan son muy importantes e incluso algunos factores que normalmente no se toman en cuenta pueden tener una influencia considerable. Por ejemplo, el tipo de agar empleado en solidificar el medio puede crear una diferencia de 2 ciclos logarítmicos en el número de células de E. coli después de un calentamiento a 52°C durante 5 minutos (Pellón y Gómez, 1979).

La injuria microbiana causada por el calor es un estado temporal y las células lesionadas tienen la capacidad de recuperar su estado fisiológico normal y volver a crecer y dividirse. El restablecimiento de las características fisiológicas y estructurales perdidas durante el daño térmico ha sido definido como "proceso de recuperación o reparación." También se le ha llamado resucitación, que quiere decir renacimiento de las células después de una muerte aparente. (Busta, 1978).



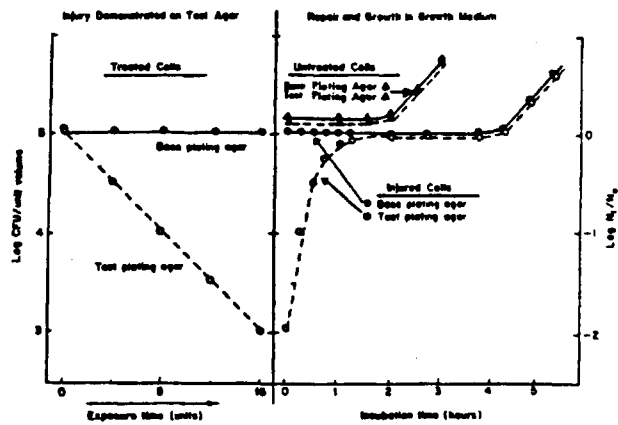


FIGURA 1. RESULTADOS HIPOTETICOS QUE DEMUESTRAN LA INJURIA DE LOS MICROORGANISMOS Y SU POSTERIOR REPARACION (BUSTA, F.F.; 1978).

La importancia práctica de la injuria térmica de los microorganismos se refiere principalmente a tres áreas en el campo de la microbiología de alimentos (Busta, 1976):

- a. Conservación y alteración de los alimentos
- b. Protección del consumidor
- c. Fabricación de alimentos y propagación de cultivos microbianos.

El ejemplo clásico se presenta cuando existiendo células que han sufrido injuria térmica no pueden detectarse porque no son capaces de formar colonias en un medio selectivo y en cambio, después de cierto tiempo, pueden reparar la injuria, crecer y producir toxinas o simplemente aparecer en gran número. (Collins-Thompson et al., 1973).

## 2. Daño térmico a las proteínas.

La injuria térmica (48°C y 52°C) inactiva muchas enzimas en Staphylococcus aureus y Salmonella typhimurium (Tomlins et al., 1971). Las deshidrogenasas son particularmente sensibles al calor. Durante el periodo de reparación la mayoría de las actividades enzimáticas se recuperan, pero en algún caso (por ejemplo la oxoglutarato deshidrogenasa) la actividad enzimática no parece que se recupere completamente. De cualquier forma es muy difícil correlacionar injuria y muerte térmica con daño y destrucción inespecífica de las proteínas celulares bacterianas.

### 3. Daño térmico en la pared celular y en la membrana exterior.

La capa de peptidoglicano de la pared celular parece ser relativamente resistente al calor (Allwood y Russell, 1970).

Hitchener y Egan (1977) estudiaron el daño producido en la membrana exterior de células de E. coli que sufrían injuria térmica y demostraron la liberación de lipopolisacáridos a partir de las mismas, sin embargo, casi la mitad de los lipopolisacáridos se liberaban en los primeros 30 segundos de calentamiento durante el shock inicial debido al cambio de temperatura y no había relación directa con el nivel de injuria. Los mismos autores concluyeron que las células bacterianas toleran una disrupción considerable de la membrana exterior sin aumentar su sensibilidad al calentamiento a 48°C. Al mismo tiempo demostraron que la presencia de iones  $Mg^{++}$  en el medio de calentamiento tenía una mayor influencia en la protección de las células bacterianas frente a la muerte e injuria térmica que en la reducción de la liberación de lipopolisacáridos. Su trabajo, junto con el de Hurst et al., (1974), resalta la importancia de los iones  $Mg^{++}$  en la sensibilidad celular a la injuria térmica.

### 4. Daño térmico en la membrana citoplásmica

La membrana citoplásmica funciona como la principal estructura celular controlando la difusión pasiva y el transporte activo de moléculas e iones hacia dentro y hacia fuera de la célula, también está relacionada con la producción de energía y con la

división y reparación del cromosoma bacteriano aunque en el último proceso el papel de la membrana no está claro.

La pérdida de material con absorbancia a 260nm y 280nm y la salida de constituyentes celulares durante el tratamiento térmico ha sido demostrado en diferentes microorganismos (Lee y Goepfert, 1975; Gray et al., 1973) lo que indica un mal funcionamiento de la membrana citoplásmica.

El transporte activo de cationes, azúcares y aminoácidos disminuye o es abolido en células lesionadas termicamente y aparentemente no vuelve a ser completamente funcional en poblaciones microbianas aún después del proceso de reparación de la injuria (Hurst et al., 1973). Esto se debe probablemente a la presencia de células inactivadas irreversiblemente en el total de la población.

El principal factor que controla el daño que el tratamiento térmico infringe en la membrana bacteriana parece ser la temperatura a la que crecieron los microorganismos antes del tratamiento. Esta temperatura de crecimiento se sabe que afecta a la relación entre ácidos grasos saturados e insaturados de la membrana (Hansen, 1971; Beuchat, 1978). El incremento en la temperatura de crecimiento ocasiona un incremento en el cociente ácidos grasos saturados/insaturados y al mismo tiempo una mayor resistencia a la inactivación térmica.

Pierson et al. (1971), trabajando con Salmonella typhimurium calentada a 48°C, demostraron que la reparación de la membrana, después del daño térmico, debe ser rápida y probablemente ocurre

al principio del periodo de reparación celular, de modo que la célula pueda subsanar completamente otras lesiones que el calor indujo. Los mismos autores sugirieron que los lípidos sintetizados despues del tratamiento térmico se empleaban para reparar el daño de la membrana, lo que fué confirmado por Tomlins et al. (1972).

#### 5. Daño térmico en los ribosomas

De las tres especies de RNA (r RNA, m RNA, t RNA) solamente el r RNA ha sido estudiado en relación con el daño térmico de los microorganismos. El r RNA representa el 80% del RNA total y el 63% del peso de un ribosoma (Waller, 1961; Pierson et al. 1978). Sin embargo, estos porcentajes no significan necesariamente que sea esta especie de RNA la más importante en los procesos que determinan la muerte ó la injuria celular.

En la bibliografía publicada, la mayoría de los estudios se refieren a la pérdida de material cuya absorbancia ocurre a 260mm (Russell y Harries, 1967) y a la degradación in vivo de los ribosomas y del r RNA, relacionando estos fenómenos con el grado de daño térmico que sufren las células. Parece claro que durante la injuria térmica hay degradación de las subunidades ribosómicas de 30 S y 50 S y de los de 16 S y 23 S del r RNA. Tambien ha sido establecido que el r RNA 16 S y la subunidad ribosómica de 30 S parecen afectarse más que el r RNA 23 S o la subunidad ribosomica de 50 S. (Sogin y Ordal, 1967). Es importante tener en cuenta que la degradación del r RNA tambien sucede en células de E. coli cuando se encuentran en un medio

con ausencia de nutrientes (Kaplan y Apirion, 1975).

Existen pruebas (Strange y Shon, 1964) que sugieren que la pérdida de iones  $Mg^{++}$  es el suceso primario en el daño producido en los ribosomas. Los iones  $Mg^{++}$  se requieren para mantener la integridad del ribosoma y además tienen cierta acción inhibidora de las ribonucleasas. Stanesh y Yang (1967) describieron la inhibición de la degradación de los ribosomas mediante iones  $Mg^{++}$ . Hurst (1977) estableció que la degradación del RNA requería pérdida de iones  $Mg^{++}$  y no calentamiento porque la reacción, una vez empezada, ocurría a 37°C.

El efecto de los iones  $Mg^{++}$  y del calor sobre el r RNA y los ribosomas parece deberse a la acción de una ribonucleasa. Es un hecho aceptado que las ribonucleasas pueden ser termoestables (hay 3 grupos de enzimas que se sabe que despolimerizan el RNA: fosfo-transferasas, fosfodiesterasas y fosforilasas)(Barnard, 1967). Natori *et al.* (1966), demostraron *in vitro* que cuando los ribosomas de *E. coli* se despliegan y pierden proteínas ribosómicas se convierten en más sensibles al ataque por ribonucleasas; esto sugiere la posibilidad de una acción combinada física y enzimática sobre los ribosomas inducida por el calor.

Las ribonucleasas son también capaces de unirse a los ribosomas sin hidrolizar su RNA (Robertson *et al.*, 1968; Ohtaka y Uchida, 1963; Spahr, 1964). Gómez (1977) propuso que esta resistencia a la hidrólisis puede ser debida a inaccesibilidad estérica y a la posible necesidad de una activación térmica de las enzimas responsables (vía la desnaturalización de un inhibidor termolábil).

De todos modos, Lee y Goepfert (1975) modificaron las condiciones experimentales de forma que no se degradara el RNA y sin embargo una proporción significativa de la población bacteriana sufriera injuria o inactivación térmica. Por lo tanto parece correcta la opinión de Gómez (Gómez, 1977) de que el daño al RNA no puede explicar por sí solo la viabilidad de las células lesionadas térmicamente.

El calor, como agente que puede tener diferentes blancos con los que interaccionar (Allwood y Russell, 1970) presenta también la posibilidad de tener diferentes sistemas o estructuras que pueden ser elementos limitantes en la reparación del daño térmico; el fallo de cualquiera de estos sistemas prevendría el normal funcionamiento celular.

#### 6. Daño térmico del cromosoma.

Hasta ahora no se ha estudiado el efecto del daño térmico en el cromosoma como tal en células lesionadas o muertas.

La bibliografía sobre el tema se refiere fundamentalmente al efecto del calor sobre el DNA celular que resulta en roturas sencillas (una cadena) o dobles (ambas cadenas del DNA escindidas por el mismo sitio). El análisis de roturas, sencillas o dobles del DNA se hace mediante ultracentrifugación en gradientes de sacarosa alcalinos o neutros (determinando la velocidad de sedimentación).

Bridges et al. (1969 a y b) demostraron la inducción de roturas sencillas en el DNA de E. coli después del tratamiento térmico (52°C). Woodcock y Grigg (1972) mostraron que no solo ocurren

roturas sencillas sino que el calentamiento (52°C) in vivo puede inducir roturas dobles. La técnica empleada fué la de los gradientes alcalinos de sacarosa de McGrath y Williams (1966) que supuestamente mide las roturas del DNA, cuya causa puede ser la hidrólisis del enlace fosfodiéster (Eigner et al., 1961; Greer y Zamenhof, 1962); sin embargo, recientemente Crine y Verly (1976) han demostrado que la desnaturalización alcalina necesaria para observar las roturas sencillas da como resultado roturas en lugares carentes de purina de la molécula de DNA. Las lesiones alcalino-labiles se deben en realidad a la escisión del enlace fosfodiéster cercano a un sitioapurínico o apirímidínico del DNA.

Son varios los investigadores que han observado la producción de mutaciones como consecuencia del daño que el calentamiento moderado produce en el DNA. Zamenhof y Greer (1958) demostraron que tratamientos térmicos a 60°C durante 2-4 horas en soluciones de sacarosa (50%) incrementaban sustancialmente la frecuencia de mutación de prototrofismo a auxotrofismo en E. coli. Baltz et al. (1976) demostraron, en el bacteriofago T-4, la inducción por el calor de transiciones GC → AT debidas a desaminación de la citosina generando uracilo; la reacción es protón-catalizada y las velocidades de reacción y energías de activación son dependientes del lugar en el DNA y están presumiblemente influenciadas por las bases vecinas.

Basados en los trabajos de Bridges et al. (1969 a y b), Sedwick y Bridges (1972) y Woodcock y Grigg (1972) la mayoría de los investigadores preocupados por este tema piensan que el calentamiento moderado (48°C - 60°C) actúa a través de la inducción de



alguna enzima(s) que se sabe ataca(n) regiones desnaturalizadas del DNA (Goldmark y Linn, 1970; Ljungquist, 1977). Se presupone que el calentamiento moderado actuando directamente no origina roturas del DNA.

Trabajando con Salmonella typhimurium LT-2, Gómez y Sinskey (1973) demostraron que para originar roturas en el DNA, era necesario someter las células bacterianas, después del tratamiento térmico, a un medio nutritivamente complejo; sus experimentos indicaron la importancia que las características genéticas y fisiológicas de las células tienen en la expresión del daño inducido por el calor. Por primera vez relacionaron las roturas del DNA con una observación conocida como "recuperación en medio mínimo" (Ganesan y Smith, 1971; Gómez et al., 1976) que consiste en que las células lesionadas térmicamente se recuperan mejor en un medio químicamente definido que en un medio nutritivamente complejo. Cuando después del calentamiento los microorganismos se incuban en un medio complejo, se producen roturas en el DNA, lo que no ocurre cuando la incubación se lleva a cabo en agua o en un medio químicamente definido. Si la incubación en el medio complejo se lleva a cabo anaerobicamente el número de roturas del DNA es mínimo y las células bacterianas son capaces de repararlas.

En 1977, Grecz y Bhatarakamol empezaron a clarificar el mecanismo de escisión del DNA después de un calentamiento moderado. Señalaron que sometiendo E. coli a un tratamiento térmico a 50°C-60°C se podían inducir escisiones en el DNA endonucleolíticamente y este parecía ser el hecho inicial de la injuria térmica. Las escisiones del DNA se determinaron en gradientes alcalinos de sacarosa. Empleando inhibidores enzimáticos (p-cloromercuriobenzoato ó  $\text{HgCl}_2$ ) y mutantes deficientes

en actividad endonucleasa II (8% de la actividad normal), obtuvieron los siguientes resultados:

- a. Los inhibidores enzimáticos añadidos al empezar el tratamiento térmico redujeron substancialmente el número de roturas del DNA lo que sugiere una inducción enzimática debida al calentamiento.
- b. El mutante deficiente en endonucleasa II exhibía menos incisiones que la cepa B/r.
- c. El número de células deficientes en endonucleasa II capaces de recuperarse despues del calentamiento fué del 30% al 80% menor que en la cepa B/r a pesar del menor número de escisiones del DNA. Esto demuestra que el sistema de reparación es menos eficaz en los mutantes (quizás se requiere endonucleasa II para la reparación del DNA).

El DNA se escindió en fragmentos relativamente grandes ( $10^6 - 10^7$  daltons) lo cual es coherente con una actividad endonucleolítica específica en determinados lugares del cromosoma.

Estos resultados no implican que el efecto del calentamiento moderado en el DNA sea unicamente a través de la inducción de alguna endonucleasa(s) o que la endonucleasa II sea la única enzima que interviene en el proceso. La posibilidad de cambios físicos en el DNA, producidos directamente por el calor, continua estando abierta. Sin embargo, estos resultados inician la descripción de los mecanismos a nivel molecular que pueden tener lugar en los primeros estadios del daño producido en el DNA por un tratamiento térmico moderado.

## 7. Reparación del daño térmico.

Las células bacterianas se califican como lesionadas y no como muertas cuando han sufrido algún daño, pero conservan la capacidad de mantener cierto funcionalismo en medios no-restrictivos y pueden recuperar después su estado fisiológico normal, seguido de crecimiento y división (Busta, 1978). Por definición, la evidencia del daño térmico debe desaparecer cuando la célula vuelve a crecer y dividirse; de esta forma queda desechada cualquier posibilidad de cambios permanentes en forma de mutaciones, como mecanismo de injuria térmica.

El proceso de reparación debe estar relacionado con la mayoría, o al menos, con algunos cambios celulares que acaecen después de un tratamiento térmico subletal que desbarate las actividades celulares. Durante la incubación que precede al nuevo crecimiento y división celular muchas de las modificaciones sufridas retornan a su estado normal (Busta, 1978): Se regeneran los ribosomas que se habían degradado durante el tratamiento térmico (Sogin y Ordal, 1967); se sintetizan fosfolípidos (Tomlins et al., 1972) y, al parecer, el proceso de reparación de algunas células dañadas requiere la síntesis de proteína (Tomlins y Ordal, 1971) y de energía en forma de ATP (Ray y Speck, 1972). También deben repararse las roturas o cortes inducidos por el calor en las cadenas del DNA (Gómez y Sinskey, 1973; Woodscock y Grigg, 1972). Es importante recordar que las actividades sintéticas de una determinada cepa o colonia, dañada por un agente específico, pueden ser únicas o singulares en el sentido de que otros agentes diferentes en cepas distintas den lugar a daños también distintos (Busta, 1976).

Si hicieramos una reconsideración general del cuadro fisiológico producido por el tratamiento térmico y de las funciones recuperadas durante la reparación, parecería que durante el tratamiento térmico la mayoría de las funciones celulares sufren alguna clase de lesión y que durante el periodo de reparación estas lesiones son reparadas en su totalidad. A fin de distinguir los sitios primarios de los secundarios dañados por el calor, y cuales han de ser reparados necesariamente, hemos de encontrar pasos limitantes durante la injuria térmica y su reparación o de alguna forma determinar la importancia relativa de las estructuras y/o funciones celulares en el proceso.

Para determinar el nivel de injuria térmica y su reparación, varios investigadores se han basado en la diferente viabilidad celular en dos o más medios de recuento diferentes (Gómez, 1977). En esta revisión trataré de concentrarme en aquellos estudios que correlacionan los cambios a nivel molecular con el recuento en diferentes medios que indica la injuria y viabilidad celular.

Iandolo y Ordal (1966) señalaron que el cloranfenicol, la penicilina y la cicloserina no afectaban la recuperación de S. aureus tratado termicamente (el sistema determinativo consistía en la recuperación de la tolerancia a la sal), pero por el contrario la actinomicina D la inhibía. Esto sugirió que durante la reparación se requería la síntesis de RNA, pero en cambio, la síntesis de proteína y de pared celular no eran imprescindibles. Mas recientemente Hurst et al. (1973) han indicado que en presencia de cloranfenicol no es posible la total recuperación de la tolerancia a la

sal en S. aureus. La necesidad de la síntesis de proteína durante la reparación de S. aureus debe investigarse, por lo tanto, más profundamente.

Iandolo (1974) estudió la recuperación de S. aureus de la injuria térmica en presencia de  $^3\text{H}$ -uracilo y  $^{14}\text{C}$ -arginina estableciendo que la síntesis de RNA se inicia inmediatamente después del tratamiento térmico y continúa a una velocidad lineal durante el período de recuperación (125 minutos). Iandolo también demostró que la síntesis de proteínas no empieza hasta aproximadamente 90 minutos del período de recuperación. Pierson et al., (1971) midieron la incorporación de glucosa U- $^{14}\text{C}$  en la fracción soluble citoplásmica, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas de S. aureus lesionado térmicamente, demostrando la rápida incorporación de radioactividad en los ácidos nucleicos seguido por un plateau después de 2 horas del período de recuperación. El plateau en la síntesis de ácidos nucleicos indicaba probablemente la existencia de otro proceso necesario para una completa reparación (por ejemplo la maduración del precursor del r RNA o de los ribosomas). Tomlins y Ordal (1971 a) confirmaron los anteriores resultados estudiando la incorporación de uracil-6- $^3\text{H}$  en S. typhimurium en el proceso de reparación de la injuria térmica; las cpm (cuentas por minuto) de  $^3\text{H}$ -uracil incorporadas aumentaron linealmente hasta alcanzar un plateau a las 4 horas aproximadamente; después de 5 horas las cpm volvieron a aumentar debido esta vez al crecimiento del microorganismo. Este plateau es importante porque indica que las células han alcanzado su complemento de ribosomas y que la

síntesis de r RNA no es el factor limitante en la velocidad de reparación (Pierson et al., 1978).

Gómez et al. (1973) y Gómez et al. (1976) emplearon inhibidores que bloquean funciones metabólicas determinadas para así poder definir las funciones metabólicas necesarias que establecen la resistencia del microorganismo a un medio nutricionalmente complejo durante la injuria térmica (recuperación en medio mínimo como sistema determinativo). La recuperación de la resistencia en medios complejos era inhibida por rifampina, cloranfenicol e hidroxiiurea pero no por el ácido nalidíxico, sugiriendo que se requiere la síntesis de RNA, proteína y DNA. La hidroxiiurea es un inhibidor de la síntesis de DNA que actúa inactivando el sistema de la ribonucleotido difosfato reductasa (Krakoff et al. 1968; Sinha y Snustad, 1972). El ácido nalidíxico se cree que actúa inhibiendo el ensamblaje de los precursores de 38 S (cadena sencilla) del DNA. (Crumplin y Smith, 1976); este paso metabólico no sería según esto necesario para reparar la injuria térmica. El principal problema al emplear inhibidores selectivos in vivo ha sido siempre que en realidad no tenemos un conocimiento completo de su función (Gómez, 1977).

Woodcock y Grigg (1972) estudiaron la reparación a 37°C en buffer fosfato de las escisiones del DNA producidas debido a un calentamiento moderado, y relacionaron el proceso con el aumento en viabilidad celular durante el período de reparación de la injuria térmica.

Debido a que algunos mutantes deficientes en los sistemas de reparación del DNA son más sensibles al calentamiento que los

microorganismos originales, Gómez (1977) especuló con la posibilidad de que la supervivencia de algunos microorganismos tratados térmicamente depende principalmente de su capacidad de reparación del DNA ó que las funciones que faltan en los mutantes tienen otras actividades además de la reparación del DNA (estas actividades serían entonces las esenciales para reparar el daño térmico). Gómez propuso que la alteración de la funcionalidad ó del control de las enzimas que llevan a cabo la actividad nucleolítica y/o la reparación podría tener como consecuencia un desequilibrio entre las velocidades de degradación y resíntesis que a su vez sería responsable de la injuria térmica.

El papel que el daño del DNA y su reparación juega como determinante de la suerte de las células tratadas térmicamente parece interesante ya que la integridad funcional de las células depende en gran medida de la integridad estructural del DNA. De la suerte que corra el DNA dependerán los demás componentes celulares que a partir del mismo se forman directa o indirectamente y que en caso de estar dañados pueden ser repuestos en vez de reparados.

La dilucidación de los mecanismos de reparación de la injuria térmica requiere un entendimiento más completo de los tipos de daño que el calor produce en el DNA y en los componentes relacionados con él in vivo, como son el RNA, la membrana celular y diferentes enzimas.

B. EL CROMOSOMA PLEGADO O NUCLEOIDE DE ESCHERICHIA COLI

1. Aislamiento, composición y propiedades.

En 1971, Stonington y Pettijohn aislaron el DNA de E. coli como una estructura compacta y no viscosa después de lisar cuidadosamente esferoplastos con detergentes no iónicos (Brij 58 y desoxicolato) en un medio de gran fuerza iónica (1 M ClN<sub>a</sub>). Previamente, las técnicas de lisis daban como resultado una espiral desordenada y viscosa de DNA (arrollamiento al azar).

Este complejo, formado principalmente por DNA y también por RNA y proteína, se llamó nucleoide o cromosoma plegado y hoy en día se cree que representa la estructura nuclear observada in vivo mediante microfotografías electrónicas (Pettijohn, 1977).

Stonington y Pettijohn estudiaron las propiedades de la nueva estructura analizándola en gradientes neutros de sacarosa, determinando su viscosidad después de diversos tratamientos físicos y químicos y hallando su composición química. El DNA sedimentaba como una estructura compacta de 3200 S aproximadamente. El contenido en DNA era del 80% en peso, y el complejo incluía también proteína (principalmente RNA polimerasa), m RNA naciente y r RNA. El tratamiento de la estructura con calor o ribonucleasa originaba un gran aumento de la viscosidad y las enzimas tripsina y pronasa no tenían ninguna influencia. Estos resultados sugirieron que el RNA tenía cierto papel en la estabilización del complejo. Desplegando el DNA mediante tratamiento con dodecilo sulfato sódico y aplicando la ecuación de Burgi-Hershey (Burgi y Hershey, 1963) resultó que el DNA del



complejo tenía el tamaño del genoma completo de E. coli ( $> 10^9$  daltons), indicando que la estructura incluía todo el DNA celular.

Worcel y Burgi (1972) emplearon básicamente el mismo método experimental de Stonington y Pettijohn excepto la temperatura de lisis (de 0°C a temperatura ambiente) y aislaron un nucleóide con un coeficiente de sedimentación que variaba entre 1300S y 2200 S. Cuando las células sufrían privación de aminoácidos, los coeficientes de sedimentación de sus nucleóides resultaron ser más homogéneos, de alrededor de 1300 S, sugiriendo que las estructuras con un coeficiente de sedimentación de 1300 S representan el cromosoma plegado en período de iniciación de la replicación y las estructuras de 2200 S representan cromosomas durante estadios más avanzados de su replicación. Los cromosomas plegados o nucleóides resultaron estar compuestos de DNA superarrollado ya que su velocidad de sedimentación mostraba la típica respuesta bifásica hacia el tratamiento con concentraciones progresivamente mayores de bromuro de etidium. Worcel y Burgi estimaron que la concentración de superhelices era aproximadamente de una revolución superhelicoidal completa cada 400 pares de bases en el DNA, que es una concentración similar a la observada en DNA circular y cerrado covalentemente (Vinograd et al., 1965). Produciendo cortes en el DNA con desoxirribonucleasa, se necesitaban de 6 a 40 cortes en cada una de las dos cadenas de DNA para desarrollar completamente el nucleóide que entonces se comportaba como DNA lineal en cuanto a la intercalación de bromuro de etidium; este nucleóide desenrollado sedimentaba más lentamente que el original pero todavía 5 veces más rápidamente que el nucleóide

desplegado. Teniendo en cuenta estos hallazgos, Worcel y Burgi propusieron un modelo para el nucleoide que tenía bucles de DNA alrededor de un núcleo; un corte en una de las dos cadenas del DNA con desoxirribonucleasa permitiría la libre rotación de las cadenas de DNA y el desenrollamiento de la superhélice en un determinado bucle (dominio) sin afectar el superarrollamiento del resto del nucleoide o cromosoma plegado.

La diferencia entre los coeficientes de sedimentación de los nucleoides obtenidos por Stonington y Pettijohn por un lado y Worcel y Burgi por otro fue explicada por Pettijohn et al. en 1973 y en 1974 por Worcel y Burgi. La lisis a 0 - 10°C o un tratamiento más sutil con detergentes daba lugar a un nucleoide de 3000 - 4000 S y en cambio la lisis a 20 - 25°C resultaba en un nucleoide de 1600 S; ambas clases de nucleoides coexistían si la lisis se llevaba a cabo a temperaturas intermedias (por ejemplo a 15°C). Los nucleoides de 3000 - 4000 S eran realmente nucleoides asociados con trozos de membrana; contenían proteínas de la membrana, lípidos y fosfolípidos además del DNA plegado y el mRNA naciente. La liberación del cromosoma plegado de la membrana fue posible in vitro incubando el complejo en Sarkosyl al 1% y 1 M ClNa a 0°C durante 15 minutos.

El nucleoide libre de membrana de 1600 S (a 17000 RPM) es un patrón muy eficiente para la síntesis de DNA y de RNA in vitro (Kornberg et al., 1974; Pettijohn et al., 1973; Giorno et al., 1975). Este nucleoide no cambia sus características de sedimentación en gradientes de sacarosa durante la transcripción, y es más eficiente como patrón para la RNA polimerasa que el DNA arrollado completa-

mente al azar o que el nucleóide después de desplegarse. Los anteriores resultados sugirieron que casi todos los patrones potenciales del DNA, en esta forma apretadamente plegada eran accesibles a la interacción con grandes moléculas (Pettijohn et al., 1973).

Al estudiar los nucleóides de células privadas de aminoácidos, Worcel y Burgi (1974) encontraron que en esas condiciones era imposible aislar nucleóides asociados a la membrana y propusieron que después de completarse la replicación del cromosoma los nucleóides eran liberados de la membrana y entonces requerían la síntesis de proteína y la adhesión a la membrana para iniciar de nuevo la replicación. Marunouchi y Messer (1973) por otra parte, trabajando con un mutante de E. coli termosensible en la iniciación de la replicación del DNA, afirmaron que aproximadamente 0.5% del cromosoma no se replica en la ausencia de síntesis de proteínas y que la replicación de este tramo se requiere para iniciar divisiones subsiguientes. Estos hallazgos no pudieron ser confirmados por Loehr y Hanawalt (1977) que indicaron que la técnica empleada por Marunouchi y Messer incluía un aumento brusco hasta la temperatura no permisiva dando lugar a un aumento en la incorporación de  $^3\text{H}$ -desoxitimidina que pudo confundir sus resultados. Dworsky y Schaechter (1973) inhibieron la síntesis de proteína y permitieron la acumulación de RNA empleando cloranfenicol y demostrando un aumento en el coeficiente de sedimentación de los nucleóides y en su grado de condensación (microfotografías electrónicas), al mismo tiempo, el número de puntos de contacto entre el nucleóide y la membrana parecía ser el doble que en los nucleóides de células normales. Estos últimos hallazgos apoyaron la idea de un aumento de la asociación nucleóides - membrana durante la inhibición de la síntesis de proteína

que es consecutiva a una privación de aminoácidos en las cepas de E. coli empleadas; además, se pensó que la RNA polimerasa juega un cierto papel en la asociación nucleóide - membrana. Ryder y Smith en 1974 y 1975, eliminando la precentrifugación a 4000g que empleaban Worcel y Burgi, y privando a las células de aminoácidos o empleando antibióticos para inhibir la síntesis de proteína obtuvieron nucleoides asociados a la membrana y con un coeficiente de sedimentación de 5000 S - 6000 S.

Los resultados contradictorios entre los laboratorios de Worcel y Burgi y Ryder y Smith pudieron explicarse cuando Korch et al. (1976) demostraron que la precentrifugación a 4000 g producía un enriquecimiento inversamente proporcional al coeficiente de sedimentación.

Análisis morfológicos de las células bacterianas privadas de aminoácidos y de su sensibilidad a la lisozima y/o a los detergentes indicaron que estas son menos susceptibles a la lisis que las células en fase exponencial (Meyer et al., 1976). Cuando las células están dividiéndose, parece que son más frágiles en la región de la envoltura celular que se está dividiendo (lo mismo ocurre después de un tratamiento con penicilina) (Lederberg, 1957).

Recientemente, Saunders (1978) describió dos clases de nucleoides (1450 S y 2130 S) en células que habían sido privadas de aminoácidos; su interpretación fue que los nucleoides de 1450 S estarían compuestos de cromosomas sencillos sin haber empezado a replicarse y los de 2130 S estarían compuestos por cromosomas completamente replicados y por lo tanto dobles. Estos resultados son

difícilmente comparables con los de Worcel y Burgi y Ryder y Smith porque el procedimiento para obtener los nucleoides era diferente.

Meyer et al. (1976) sugirió que la unión entre el nucleóide y la membrana era un artefacto de la técnica empleada. Según él, el cromosoma sería atrapado por las envolturas celulares (pared y membrana celular) en forma de estructuras vesiculares.

La composición de la membrana asociada al nucleóide ha sido estudiada lisando cuidadosamente células de E. coli en presencia de iones de signo contrario al DNA (espermidina 5 mM), tratamiento que daba como resultado nucleoides asociados a la membrana (Portalier y Worcel, 1976; Drlica et al., 1978). Todas las proteínas de la membrana exterior y solo unas pocas de la membrana citoplásmica formaban parte del complejo nucleóide - membrana; tratando el complejo ( $\sim 5800$  S) con sarkosil en  $\text{ClNa}$  1M se solubilizaba la membrana, liberando un nucleóide de 1700 S; un tratamiento exhaustivo del complejo con desoxirribonucleasa I daba lugar a un trozo de membrana en forma de vesícula que sedimentaba a 4000 S. Si el tratamiento con sarkosyl se llevaba a cabo a baja concentración de sal era imposible solubilizar la mayoría de las proteínas de la membrana exterior, resultado que resalta la importancia de las fuerzas electrostáticas en la asociación DNA - membrana. Portalier y Worcel (1976) sugirieron que la asociación entre el DNA y la membrana exterior debe ser indirecta y debida a interacciones entre la membrana citoplásmica y la membrana exterior a través de la pared celular. Desplegando el nucleóide mediante un tratamiento a  $37^{\circ}\text{C}$  en 0,05M  $\text{ClNa}$  durante 2 horas, éste continua estando asociado y cosedimentando con las

envolturas celulares pero el gran efecto de fricción del DNA desplegado reduce el coeficiente de sedimentación del complejo hasta 2000 S; la eliminación parcial del DNA con endonucleasas de restricción resulta en una estructura que sedimenta aproximadamente a 3500 S (Drlica et al., 1978).

Los fofolípidos del nucleóide asociado con membrana han sido analizados por Lacombe y Lubochinsky (1977) concluyéndose que las membranas citoplásmica y exterior forman parte del complejo en unas proporciones similares a las encontradas en la bacteria completa.

El examen de fragmentos purificados de las envolturas celulares que acompañan al nucleóide mediante microscopio electrónico reveló que más del 80% están en forma de vesículas (Drlica et al., 1978). Materman y Van Gool (1978) también encontraron vesículas en preparación de nucleóides asociados con membrana aislados a elevadas concentraciones de sal ( $1M\ ClNa$ ). Al visualizar los cambios morfológicos durante la liberación de los nucleóides de células de E. coli, los mismos autores no pudieron observar la formación de esferoplastos después del tratamiento con lisozima y/o después del tratamiento con la solución detergente. La estructura de las envolturas celulares resultantes dependía de la temperatura de lisis. A  $0^{\circ}C$  observaron envolturas celulares formando circunvoluciones mientras que elevando la temperatura de incubación a  $20^{\circ}C - 25^{\circ}C$  las envolturas aparecían lisas y con una única abertura; en este último caso, las secciones de la célula a distintos niveles reveló que no había interrupciones adicionales en las envolturas celulares lo que sugería que todo el contenido celular incluyendo el nucleóide era eliminado

a través de la única abertura. Si prolongamos la incubación del lisado a alta temperatura el nucleoide se despliega parcialmente y fragmentos de las envolturas celulares, que están convirtiéndose en vesículas en ese momento, quedan atrapadas en los nucleoides.

En la Tabla 1 aparece un resumen de los componentes y propiedades del nucleoide libre y del nucleoide asociado con membrana (Pettijohn, 1976).

## 2. Efecto de la velocidad de centrifugación en el coeficiente de sedimentación del nucleoide.

El efecto que el campo centrífugo tiene en la velocidad de sedimentación del DNA desplegado de alto peso molecular ha sido observado por diferentes autores (Rubenstein y Leighton, 1971; Osmerod y Lehman, 1971; Kavenoff, 1972; Levin y Hutchinson, 1973; Schumaker y Zimm, 1973). El coeficiente de sedimentación a altas velocidades era bajo mientras que a poca velocidad alcanzaba un máximo gradualmente. Zimm (1974) propuso una teoría basada en la diferente fricción sufrida por los extremos de un polímero de DNA comparado con la parte media que está más resguardada. Durante la centrifugación, los extremos tenderían a avanzar mas lentamente y quedarían rezagados lo que daría lugar a una disminución en el coeficiente de sedimentación a altas velocidades. La magnitud de la distorsión dependería de la fuerza centrífuga y de la distancia de un extremo al otro del polímero de DNA. Chia y Schumaker (1974) indicaron la importancia de usar un campo centrífugo bajo al demos-

TABLA 1

**ESCHERICHIA COLI : COMPONENTES Y PROPIEDADES DE SUS NUCLEOIDES. (PETTIJOHN, D.E.; 1976)**

	Membrane-free nucleoid	Membrane-associated nucleoid
DNA content (weight fraction) <sup>a</sup>	0.6	~0.4
RNA content (weight fraction) <sup>a</sup>	0.3	0.15-0.35
Protein content (weight fraction) <sup>a</sup>	0.05-0.1	~0.4
Lipid content (fraction of total labeled lipid)	<1%	~20%
Sedimentation rate (weight average)	1600S <sup>c</sup>	3200S <sup>c</sup>
Buoyant density in CsCl	$1.69 \pm 0.02 \text{ g/cm}^3$	$1.46 \pm 0.02 \text{ g/cm}^3$
DNA mass per singlet nucleoid	$9 \pm 1.0 \times 10^{-9} \mu\text{g}$	-
DNA mass per doublet nucleoid	$15 \pm 2 \times 10^{-9} \mu\text{g}$	-
Genome equivalents per singlet	2.2	-
Genome equivalents per doublet	3.6	-
Fraction of total cellular membrane bound	<0.01	~0.2
Bound proteins		
RNA polymerase	Yes	Yes
Envelope proteins	Little or none	Yes

<sup>a</sup>Weight fraction means fraction of total nucleoid dry weight.

<sup>b</sup>Lipids labeled with <sup>14</sup>C-oleic acid.

<sup>c</sup>Determined at 17,000 rpm and uncorrected for rotor speed dependence. When extrapolated to zero rotor speed, the rates are approximately 20% greater.



trar que el DNA de bajo peso molecular puede sedimentar más rápidamente que DNA de mayor peso molecular si la velocidad de centrifugación es suficientemente alta.

Debido a que el nucleoide es una estructura compacta (diríamos particulada debido a su baja viscosidad específica y alto coeficiente de sedimentación), los primeros investigadores que lo definieron no esperaban que la velocidad de centrifugación tuviera ningún efecto en él, pero, contrariamente a esas esperanzas, Hecht *et al.* (1977) demostraron que el coeficiente de sedimentación del nucleoide de *E. coli* dependía de la fuerza del campo centrífugo. El nucleoide libre de la membrana y también el nucleoide asociado con la membrana aumentaban su coeficiente de sedimentación a medida que el campo centrífugo disminuía. Este cambio en el nucleoide era reversible y no era debido a ninguna pérdida de masa en sus componentes. Extrapolando la velocidad de centrifugación a cero, el nucleoide libre de membrana tenía un coeficiente de sedimentación de 1900 S mientras que a 30.000 RPM este coeficiente era de 1000 S. El nucleoide asociado con la membrana mostraba un efecto aún mayor y su coeficiente de sedimentación variaba de 5500 S a cero RPM (extrapolado) a 2500 S a 25.000 RPM. Pettijohn *et al.* (1978) propusieron un modelo para explicar el efecto de la velocidad de centrifugación en el coeficiente de sedimentación sugiriendo que la parte terminal de los bucles del DNA en el nucleoide se comportan hidrodinámicamente igual que los extremos de una doble hélice lineal de DNA y por tanto resultan más extendidas cuanto mayor es el campo centrífugo aumentando así su coeficiente de fricción. La ecuación de Zimm (1974)

aplicada a este modelo demostró la coherencia entre los valores del coeficiente de sedimentación calculados y los obtenidos experimentalmente.

### 3. Superarrollamiento y organización del DNA en el nucleóide.

Kleinschmidt et al. (1961) describieron por primera vez los bucles del DNA en forma superarrollada. El nucleóide visto en microfotografías electrónicas (Delius y Worcel, 1974) posee zonas (dominios) de superarrollamiento que aparecen como bucles sin extremos visibles. Kavenoff y Bowen (1976) observaron una estructura similar y, demostraron que la organización de los bucles de DNA superarrollado estaba ligada a un núcleo constituido por RNA. Cuando la concentración de sal (acetato amónico) en la hipofase disminuía de 1 M a 0,4 M y luego a 0,15 M, el núcleo de los nucleóides se agrandaba y pasaba de ser fibroso a ser denso a los electrones y después a tener una estructura ramificada. Según esto, la estabilización del complejo que poseía RNA naciente y ribonucleoproteína, además de DNA, disminuía con la disminución de la concentración de sal. La idea de que el RNA naciente se agregaba y estabilizaba el DNA era coherente con las indicaciones de que los nucleóides de E. coli son inestables en concentraciones altas de sal ( $\text{ClNa}$  1 M), después de un tratamiento con rifampicina (que inhibe la iniciación de la síntesis de RNA) (Dworsky, 1975) y también con otros trabajos que demuestran una alteración del núcleo de las células tratadas con rifampicina, cuando se observan secciones finas de las mismas (Dworsky y Schaechter, 1973). Además, la idea es también

coherente con la tendencia a agregarse del RNA cuando está en un medio con alta concentración salina (Boedtker, 1968).

Recientemente, Masterman y Van Gool (1978) han descrito al nucleoide al ser liberado de la célula como una fibra arrosariada y ramificada que cuando es expuesta a una alta concentración salina se pliega formando espirales irregulares. Este proceso se vió que era reversible.

Empleando desoxirribonucleasa para relajar el superarrollamiento, Worcel y Burgi (1972) estimaron que el número de zonas (dominios) de superarrollamiento era de 12 a 80. Lydersen y Pettijohn (1977) emplearon la irradiación con rayos gamma para producir roturas al azar en el DNA (al contrario que la desoxirribonucleasa) y encontraron que se necesitaban 250 roturas o incisiones sencillas (en una cadena de DNA) por genoma para relajar el superarrollamiento. De estos resultados y mediante el uso de la distribución estadística de Poisson, dedujeron que en el nucleoide hay aproximadamente 100 ( $\pm 30$ ) dominios de superarrollamiento por genoma. Estudios similares llevados a cabo por Ulmer (1978) con dosis más bajas de rayos gamma, que no produjeron un relajamiento completo del superarrollamiento, permitieron calcular unos 170 dominios por genoma.

Otros agentes que disminuyen el coeficiente de sedimentación debido a una relajación de los dominios de superarrollamiento son aquellos que inducen rotura del DNA, como la radiación ultravioleta (Ulmer, 1978), mitomicina C (Cook y Brazell, 1976) y metil-metano-sulfonato (Kleppe y Lossius, 1978). Drlica y Snyder (1978) han demostrado también que un tratamiento de células de E. coli in vivo

con coumermicina A produce una reducción en la densidad superhelicoidal del DNA. La coumermicina es un inhibidor de la DNA girasa (Gellert et al., 1976 a y b). El hecho de que el DNA permaneciera intacto después del tratamiento sugiere que la pérdida de las superhélices (superarrollamiento) era debida unicamente a la relajación del DNA (Drlica y Snyder, 1978).

Hecht et al. (1977) propusieron que el efecto de la velocidad de centrifugación en el nucleoide era una herramienta válida para estudiar qué clase de interacciones mantenían la estructura. Indicaron que solamente se observan cambios en el efecto producido por la velocidad de centrifugación cuando el DNA del nucleoide estaba desplegado o desdoblado, pero no cuando se relajaba el superarrollamiento. La relajación del superarrollamiento producía unicamente una reducción del coeficiente de sedimentación. Cuando se digiere todo el RNA del nucleoide con ribonucleasa el efecto de la velocidad de centrifugación es máximo y similar al que se obtendría teóricamente con un genoma lineal intacto del DNA de E. coli (Zimm, 1974). Desproteinizando el nucleoide, no se pudo incrementar este efecto. Debido a estos resultados, Hetch et al., sugirieron que todos o casi todos los pliegues del DNA del nucleoide estaban estabilizados por interacciones DNA - RNA y solamente las proteínas que unen el RNA al DNA (como la RNA polimerasa) pueden representar una fuerza adicional. El nucleoide libre de RNA tiene un coeficiente de sedimentación extrapolado (a velocidad de centrifugación cero)  $S_0$  de 450 S y el DNA que está parcialmente desplegado y desproteinado tiene un  $S_0$  de 320 S. Este último nucleoide desplegado y desprotei-

nizado representaría el DNA de E. coli intacto y replicándose (cromosoma a la Cairns). La diferencia entre los nucleoides desplegados con ribonucleasa y los desproteinizados concuerda con el hallazgo de que el  $1 \pm 0.3\%$  de la masa del RNA ligado al DNA es resistente a la degradación con ribonucleasa.

La organización del nucleoide y las estructuras resultantes despues de diversos tratamientos puede observarse en la Figura 2.

#### 4. Efectos del calor en el nucleoide.

El efecto del calor en el nucleoide de E. coli solo ha sido estudiado hasta ahora in vitro como una herramienta para observar que fuerzas determinan el plegado de DNA.

Cuando en 1971 Stonington y Pettijohn aislaron por primera vez nucleoides, emplearon el calor para hallar la resistencia del complejo. Un tratamiento a 50°C durante 5 minutos producía un gran incremento en la viscosidad, lo que indica un desplegamiento del DNA. Drlica y Worcel (1975) tambien observaron por viscosimetría que el nucleoide calentado sufría primero un incremento de la viscosidad entre 40°C y 50°C (10 minutos). A 50°C se alcanzaba un plateau en al viscosidad seguido por otro aumento brusco, hasta 80°C aproximadamente en que se observaba un gran descenso debido posiblemente a roturas en el DNA. Observando el efecto de los mismos tratamientos analizando la sedimentación en gradientes neutros de sacarosa, se apreciaba una pérdida de densidad entre 45°C y 50°C y un despliegue completo del DNA entre 60°C y 70°C. Este despliegue por calor era

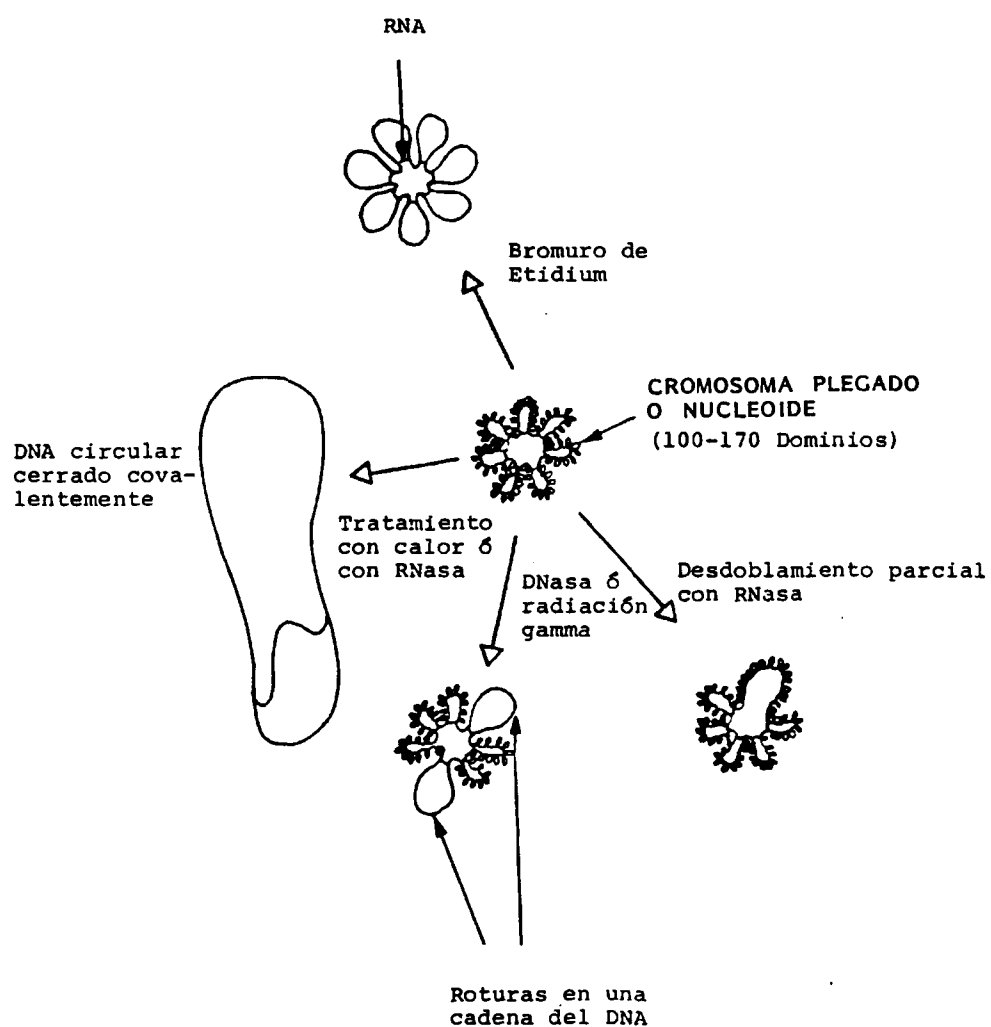


Figura 2. MODELO DE LA ORGANIZACION DEL DNA EN EL NUCLEOIDE O CROMOSOMA PLEGADO DE *E. COLI* (Modificación del modelo de Pettijohn, 1976).

irreversible y variaba con la fuerza iónica de los solventes.

Refiriéndose a los estudios de viscosimetría, Pettijohn (1976) indicó que, incluso cuando la técnica es muy sensible, hay que tener mucho cuidado al interpretar los resultados porque parece que mientras el DNA se despliega en el viscosímetro, tienen lugar ciertas reacciones cruzadas (interacciones) entre los nucleoides.

Flink y Pettijohn (1975) estudiaron la influencia del medio de calentamiento en la estabilidad del nucleoide. En un medio con  $\text{ClNa}$  (0,1M) y espermidina (2mM), se necesitaba un calentamiento a 55°C durante 5 minutos para desplegar la mitad de los nucleoides mientras en espermidina 5mM se necesitaban 70°C. Cuando la concentración de espermidina superaba los 2mM se podían observar ocasionalmente agregaciones de nucleoides. Solamente con fines comparativos, señalaremos que la temperatura ( $T_m$ ) de desnaturalización de la doble hélice del DNA de E. coli es de 80°C a 90°C.

El RNA, que en el nucleoide está asociado al DNA, puede liberarse calentando el complejo (Pettijohn et al., 1973; Hetch y Pettijohn, 1976). Después de tratar térmicamente un nucleoide (RNA y DNA marcados), se estudió la pérdida de RNA en gradientes de densidad de  $\text{Cl Cs}$ , determinándose que para liberar el RNA del DNA se requieren temperaturas mayores de 50°C (5 minutos). Entre 50°C (5 min.) y 90°C (5 min.) hay una liberación progresiva de RNA, lo que indica cierta heterogeneidad al tratamiento térmico de la asociación DNA - RNA. A 96°C (5 min.) todo el RNA detectable se había liberado y formaba una banda de sedimentación en un lugar diferente al del DNA.

El calor ayudaba también a disociar el 1% de RNA unido al DNA que era especialmente resistente a la degradación con ribonucleasa. Cuando el complejo se calentaba con ribonucleasa, antes de una segunda incubación, la fracción resistente se convertía en sensible (Hetch y Pettijohn, 1976) a este tratamiento.

La disociación total de la proteína del nucleóide se puede obtener después de una incubación de 45 a 60 minutos a 70°C (Hetch *et al.*, 1977; Lydersen y Pettijohn, 1977). El nucleóide resultante está desplegado y desproteínizado y tiene un coeficiente de sedimentación de 300 S a 2500 RPM, o sea su velocidad de sedimentación es aproximadamente 10% menor que la del nucleóide desplegado usando ribonucleasa. Fue imposible obtener un coeficiente de sedimentación menor tratando al nucleóide desproteínizado con pronasa o con dodecil sulfato sódico indicando que no era posible una desproteínización adicional. El efecto de la velocidad de centrifugación en este nucleóide era el mismo que el obtenido para los nucleóides desplegados con ribonucleasa o con calor - dodecil sulfato sódico (Hetch *et al.*, 1977). Esto sugiere que los tres están constituidos por DNA intacto y desplegado (en periodo de replicación).

Recientemente, Ulmer (1978) empleó el calentamiento como agente desproteínizante y obtuvo un coeficiente de sedimentación para el nucleóide desplegado de 610 - 640 S (a 3000 RPM). La diferencia de este resultado con el de Hetch *et al.* (1977) se explicó como debido al empleo de diferentes patrones para determinar el coeficiente de sedimentación y posiblemente también a la degradación de



los patrones empleados por Hetch.

El único efecto descrito sobre la acción del "calentamiento in vivo" en el nucleóide se debe a Cunningham y Berger (1977). Creciendo un mutante de E. coli termosensible en la iniciación del DNA (dna A) y transfiriéndolo antes de aislar el nucleóide a la temperatura no-permisiva (43°C), estos autores obtuvieron un pico agudo a aproximadamente 1500 S (12000 RPM). Cuando las células se incubaron de nuevo a la temperatura permisiva (30°C) el nucleóide volvió a disminuir su coeficiente de sedimentación hasta 1300 S. Cunningham y Berger atribuyeron estos cambios en el coeficiente de sedimentación a modificaciones en la conformación del nucleóide pero sin especificar a que clase de modificaciones conformacionales se referían.

No existen trabajos publicados acerca de la función ejercida por unas proteínas, similares a las histonas, descubiertas recientemente en el cromosoma de E. coli (Rouviere-Yaniv y Gros, 1975; Varshavsky et al., 1977); sin embargo, conviene tener presente que estas proteínas, aunque no representan un gran porcentaje del peso del nucleóide, se unen aparentemente al DNA produciendo un engrosamiento de las cadenas de DNA (microscopía electrónica). Estas proteínas se piensa que están distribuidas uniformemente a lo largo del DNA (Varshavsky et al., 1977) y sería lógico pensar que tienen alguna relación con la respuesta del nucleóide al calor.

### III MATERIALES Y METODOS

#### A. Productos Químicos

##### 1. Generales

El Sarkosyl NL-95 (N-laurilsarcosinato sódico) fué un regalo de CIBA-GEIGY Dyestuffs and Chemicals Division, Greensboro, North Carolina, USA. El Fluorinert FC-48 nos fué proporcionado gratuitamente por la compañía 3M, Saint Paul, Minnesota, USA. El Angio-CONRAY (iotalamato sódico) procede de la División Farmaceutica de Mallinckrodt. La sacarosa es especial para gradientes de densidad (libre de ribonucleasa) y se obtuvo de Schwarz-Mann. El resto de productos químicos proceden de Sigma Chemical Co.

##### 2. Material radioactivo.

Metil ( $^3\text{H}$ )-timidina (40 Ci/m mol), metil-( $^3\text{H}$ ) timidina (47.5 mCi/m mol), L-(4,5 -  $^3\text{H}$ )-leucina (60 Ci/m mol), (2- $^3\text{H}$ )-glicerol (200 mCi/m mol), Aquasol y miniviales proceden de New England Nuclear, Boston, Massachusetts, USA.

##### 3. Enzimas.

Lisozima, procedente de clara de huevo (muramidasa) grado I, cristalizada 3X, 38500 U/mg se obtuvo de Sigma Chemical Co.

"La mención de marcas comerciales no significa que el autor las recomiende con preferencia a otras del mercado."

## B. Microorganismos.

La cepa utilizada es una derivada de Escherichia coli K-12 de la colección de cultivos del Dr. P. Howard-Flanders, designada AB 1157, que es wild-type en cuanto a capacidad de reparación (Howard-Flanders y Theriot, 1966; Howard-Flanders et al., 1966; Emerson, 1968), y fué conseguida a través del Dr. David Botstein, del Departamento de Biología de MIT como cepa designada por él D5608. Nuestra cepa (KU105) se aisló a partir de la D5608 en el laboratorio de Ciencia de Alimentos de MIT por el Dr. Kevin Ulmer (1978). En su aislamiento se empleó una selección con trimetoprim (Miller, 1972) para obtener cepas capaces de crecer a una concentración de timina de 2 µg/ml (requerimiento escaso de timidina). La cepa así obtenida se mantuvo en placas de Agar Luria a temperatura ambiente y se sembraba para su conservación cada dos semanas en el mismo medio. Las características de nuestra cepa quedan reflejadas en la Tabla 2.

## C. Medios microbiológicos y soluciones tampón (bufferes)

El buffer M9 contenía los siguientes ingredientes por litro;  $\text{Po}_4\text{HN}_a$  7 g.,  $\text{Po}_4\text{H}_2\text{K}$  3 g.,  $\text{ClN}_a$  0,5 g.,  $\text{ClNH}_4$  1 g.,  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 25 g. El medio Agar Luria contenía por litro: Bacto-Tryptona 10 g.,  $\text{ClN}_a$  10 g., Bacto-extracto de levadura 5 g., y Bacto-agar 15 g.. Todos estos componentes se obtuvieron de Difco. El buffer fosfato para las diluciones estaba a pH 7 (0,067M).

TABLA IICARACTERISTICAS DEL E. COLI K-12, KU 105

Indicadores de auxotrofismo:    thy  
   arg  
   his  
   leu  
   pro  
   thr  
   thi

Utilización de azúcares:        lac<sup>-</sup>  
   gal<sup>-</sup>  
   ara<sup>-</sup>  
   xyl<sup>-</sup>  
   mtl<sup>-</sup>

Resistencia a los fagos:        T6

Resistencia a los antibióticos: str  
   mtc

#### D. Condiciones de cultivo del microorganismo

El medio de cultivo (medio químicamente definido) se preparó inmediatamente antes de usarlo. Para ello se combinaron 10 ml del buffer M9 a doble concentración; 10 ml de una solución de aminoácidos que contenía disoluciones  $2 \times 10^{-3} M$  de L-arginina; L-histidina, L-leucina, L-prolina y L-treonina; 0,15 ml de una solución de glucosa al 40%; 0,1 ml de una solución de tiamina (0,1 mg/ml; esterilizada por filtración); y 0,2 ml de una solución de timina (1 mg/ml).

Se prepararon cultivos inoculando una cantidad dada (20 ml) del medio descrito anteriormente con microorganismos procedentes de placas de Agar Luria; la incubación se llevó a cabo a 37°C durante 12-18 horas con agitación (220 rpm). A partir de este cultivo en fase estacionaria se realizó un subcultivo (0,2 ml) en el mismo medio definido (20 ml) conteniendo esta vez la cantidad apropiada de material radiactivo y diferentes cantidades de glucosa (ahora 0,25 ml) y timina ahora 10  $\mu l$ ). Estos últimos cultivos crecieron a 37°C durante 4 horas sometidos a agitación (150 rpm) y alcanzaron en estas condiciones la fase exponencial.

#### E. Marcaje radiactivo de los cultivos

Los productos químicos radiactivos se añadieron al medio al realizar el subcultivo. Las cantidades de material radiactivo fueron las siguientes; 200  $\mu l$  (20  $\mu Ci$ ) de  $^{14}C$ -timidina; 50  $\mu l$  (50  $\mu Ci$ ) de  $^3H$ -timidina; 100  $\mu l$  (100  $\mu Ci$ ) de  $^3H$ -glicerol y 200  $\mu l$  (200  $\mu Ci$ ) de  $^3H$ -leucina. Cuando los experimentos inclufan doble marcaje (leucina-timidina), el medio de cultivo contenía solamente 1/10 de la cantidad normal de leucina.

#### F. Tratamiento Térmico

Al alcanzar los cultivos la fase exponencial (4 hr, 37°C, 150 rpm) el Erlenmeyer en que se encuentran se lleva a un baño New Brunswick a 50°C ( $\pm 0,2^\circ\text{C}$ ) (150 rpm, el tiempo para alcanzar la temperatura de trabajo fué de 60-90 segundos). Después del tratamiento térmico los cultivos se enfriaron a 0°C ó en otros casos se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la recolección de las células por centrifugación (7000 rpm, 5 minutos, 4°C). El sobrenadante se decantó y el sedimento (células) fué resuspendido en la solución A (ver la sección G) que es el primer paso en la obtención de los nucleoides.

Cuando se llevaron a cabo experimentos de reparación del daño térmico in vivo, el sedimento (células) fué resuspendido en 20 ml del medio químicamente definido e incubado a 37°C (150 rpm) durante diversos periodos de tiempo antes de volver a centrifugar para poder aislar posteriormente los nucleoides de las células; simultáneamente, se tomaron alícuotas para hacer diluciones seriadas en el buffer fosfato y determinar el número de microorganismos viables en Agar Luria. El recuento se llevó a cabo poniendo 0,1 ml de cada dilución en la superficie del Agar Luria presolidificado en placas y extendiendo el líquido con una varilla de cristal estéril.

Cuando los cultivos se trataban térmicamente (50°C) durante poco tiempo (menos de 10 minutos), la técnica se cambió para minimizar la manipulación después del tratamiento. En esta "técnica rápida", los cultivos se centrifugaron para recoger las células en fase exponencial y al sedimento celular se le añadieron 0,75 ml del

medio definido a 0°C. 0,1 ml de esta suspensión celular se transfirieron a tubos de ensayo (12x75 mm) que fueron tratados térmicamente a 50°C (150 rpm) en el baño New Brunswick durante periodos de tiempo diferentes. Inmediatamente despues de finalizar el tratamiento, se procedió a obtener los nucleoides de las células.

#### G. Aislamiento de los cromosomas plegados o nucleoides

En el procedimiento normal (el más empleado en esta tesis), los cultivos tratados térmicamente (aproximadamente  $4 \times 10^9$  células) se centrifugaron y el sedimento (células) se resuspendió en 3 ml de solución A a 0°C. La solución A estaba compuesta de 20% (w/v) de sacarosa, libre de ribonucleasa, 0,1 M de  $\text{ClN}_4$  y 0,01 M de Tris-ClH buffer (pH 8,2). Una alícuota (0,2 ml) de esta suspensión celular fué transferida a tubos de ensayo (12x75 mm) y mantenida a 0°C. Cuando se empleó la "técnica rápida" explicada en la sección anterior, la suspensión celular tratada térmicamente (0,1 ml; aproximadamente  $5 \times 10^8$  células) se diluyó con 0,1 ml de solución A a doble concentración y 0°C. En ambos casos (procedimiento normal y "técnica rápida") se añadieron posteriormente 0,050 ml de solución B a 0°C y los tubos se agitaron ligeramente. La solución B contenía 0,12 M Tris-ClH buffer (pH 8), 50 mM EDTA y 4 mg/ml de lisozima y se preparaba semanalmente.

Cuando se buscaba unicamente el aislamiento de nucleoides libres de membrana, los tubos de ensayo se transfirieron a un baño a 25°C durante 5 min. con agitación ocasional. Si lo que se pretendía era el aislamiento de nucleoides asociados con membrana, la

incubación se llevaba a cabo a 0°C durante 6 min. En el primer caso, después de la incubación a 25°C durante 5 min., los tubos de ensayo se transfirieron a 0°C durante 1 minuto antes de añadir 0,25 ml de solución C a 0°C. Esta solución C contenía 1% (w/v) de Brij-58 (polioxietileno 20-cetil eter), 0,4% (w/v) de deoxicolato sódico, 2% (w/v) de Sarkosyl NL-97 (lauril sarcosinato sódico), 2 M  $\text{ClNa}_2$  y 10 mM EDTA (pH 8,2). La solución C se preparaba cada 2 semanas y se mantenía a 4°C. En caso de querer aislar nucleoides asociados con membrana, la solución empleada, a la que se denominó C', era la misma solución C sin Sarkosyl NL-97; por lo demás el tratamiento era el mismo. Después de la adición de las soluciones C ó C' a 0°C, los tubos de ensayo fueron agitados ligeramente para mezclar la solución detergente con la suspensión de esferoplastos. La suspensión, que era turbia, pasó a ser transparente a los pocos segundos pero se mantuvo a 0°C durante 15 minutos. De este lisado celular se tomaron 0,1 ml para colocarlos cuidadosamente en gradientes neutros de sacarosa con una pipeta Clay-Adams con una punta plástica de boca ancha.

#### H. Centrifugación en gradientes de sacarosa

Los gradientes de sacarosa (10-50% w/v) se formaron con soluciones que contenían 1M  $\text{ClNa}_2$ , 0,01 M de Tris-ClH buffer (pH 8,2), 1 mM de EDTA y sacarosa especial para gradientes de densidad (libre de ribonucleasa). Se emplearon específicamente gradientes de 10% a 50% porque en ellos se pueden observar simultáneamente la presencia, en el perfil de sedimentación, de nucleoides libres de



membrana y de nucleoides asociados a la membrana. Los gradientes se formaron individualmente a temperatura ambiente empleando una cámara mezcladora de gradientes Buchler y su correspondiente bomba peristáltica. Previamente a la formación de los gradientes (4,8 ml) se colocó en el fondo de los tubos de centrifuga una capa (0,3 ml) de alta densidad compuesta de sacarosa (50%, w/v) disuelta en Angio-CONRAY (80% iotalamato sódico). Todos los gradientes se formaron en tubos de centrifuga de nitrato de celulosa (2,3x5,1 cm) y se enfriaron posteriormente a 4°C durante al menos 2 horas antes de usarse.

Algunas veces, antes de centrifugar los gradientes, se añadieron 10 µl de bacteriofago T-4 marcado con  $^{14}\text{C}$ -timidina que servía de indicador de coeficientes de sedimentación. El fago T-4, que tiene un coeficiente de sedimentación de 1025 S (Cummings, 1964) nos fué amablemente proporcionado por el Dr. K. Ulmer (1978).

Los gradientes con el lisado celular se centrifugaron en una ultracentrifuga Beckman L5-75 con un rotor Sw 50.1 de cubetas oscilantes a 4°C. Esta ultracentrifuga tiene un integrador de  $\omega^2 t$  de modo que cuando se usa en Preset integra automáticamente el total  $\omega^2 t$  (campo centrífugo total) sin tener en cuenta la velocidad del rotor (rpm). La velocidad de rotor empleada fué normalmente 4000 rpm par minimizar el efecto conocido como "efecto de la velocidad del rotor" (rotor speed effect) en el nucleoide de E. coli (Hecht et al., 1977). El total  $\omega^2 t$  fué siempre  $6 \times 10^9 \text{ rad}^2/\text{sec}$ .

Los gradientes se fraccionaron por la parte superior usando un fraccionador ISCO modelo 640 Density Gradient Fractionator. Fluori-

nert FC-48 que es una solución densa y no miscible se bombeó a través de la parte inferior del tubo de centrifuga a un flujo de 1 ml/min. Las fracciones de 0,2 ml se recogieron en miniviales Beckman y la radioactividad se contó en un contador de centelleo Beckman LS-230 despues de añadir 3 ml de Aquasol (más 10% w/v de H<sub>2</sub>O) por fracción.

Algunas veces se introdujeron cambios de menor importancia en las técnicas expuestas en esta sección de Materiales y Métodos; cuando esto ocurre, las variaciones se detallan en la sección de Resultados.

#### IV RESULTADOS

##### A. Daño térmico

###### 1. Curva de supervivencia

La curva de supervivencia (ó destrucción) del Escherichia coli K-12 cepa KU 105 (wild-type en la capacidad de reparación) sometido a un tratamiento térmico a 50°C se observa en la Figura 3. Como era de esperar, la pérdida de la capacidad de formar colonias en Agar Luria es exponencial con respecto al tiempo de calentamiento. La absorbancia a 660 nm (Klett) solamente decae significativamente despues de 30 minutos de tratamiento.

###### 2. Nucleoides tratados térmicamente in vivo

Cuando las células bacterianas que están creciendo exponencialmente se tratan térmicamente a 50°C de 0 a 10 minutos y, sin posterior enfriamiento, se lisan inmediatamente para obtener sus nucleoides, se observa un aumento progresivo en el coeficiente de sedimentación de estos nucleoides (Figura 4). El nucleoide normal de las células que están creciendo exponencialmente tiene un coeficiente de sedimentación de alrededor de 1800 S a una velocidad de centrifugación de 4000 rpm (Pettijohn et al., 1978). El aumento del coeficiente de sedimentación del nucleoide, despues del tratamiento térmico, vá acompañado de un aumento de la proteína asociada al mismo. Al aumentar el tiempo de calentamiento, el perfil de sedimentación tiende a ensancharse y despues se forma

FIGURA 3: CURVA DE SUPERVIVENCIA DE ESCHERICHIA COLI K-12  
DESPUES DEL TRATAMIENTO TERMICO

Los cultivos en fase exponencial se calentaron a 50°C según se explica en Materiales y Métodos. Los recuentos se realizaron por duplicado en placas de Agar Luria (0.1 ml/placa; incubación a 37°C durante 48 horas) tras diluir las correspondientes alicuotas en bufer fosfato. Las unidades Klett representan la absorbancia a 660 nm medida en un colorímetro Klett-Summerson.

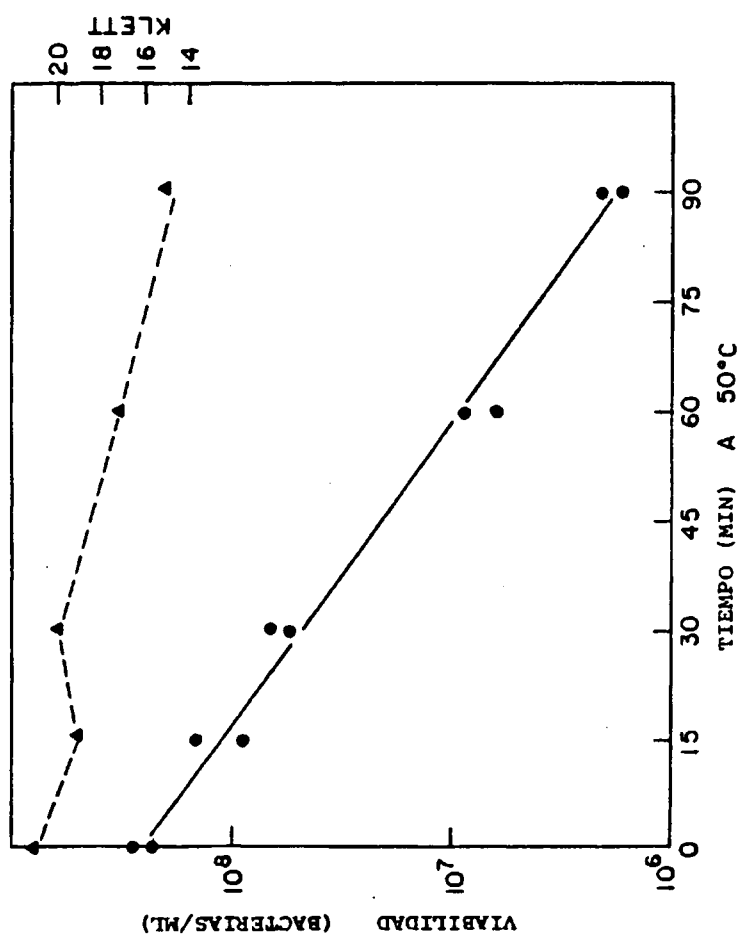


FIGURA 4: PERFILES DE SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES  
PROCEDENTES DE CELULAS CALENTADAS (0-10 MIN A  
50°C) SIN ENFRIAMIENTO POSTERIOR A 0°C.

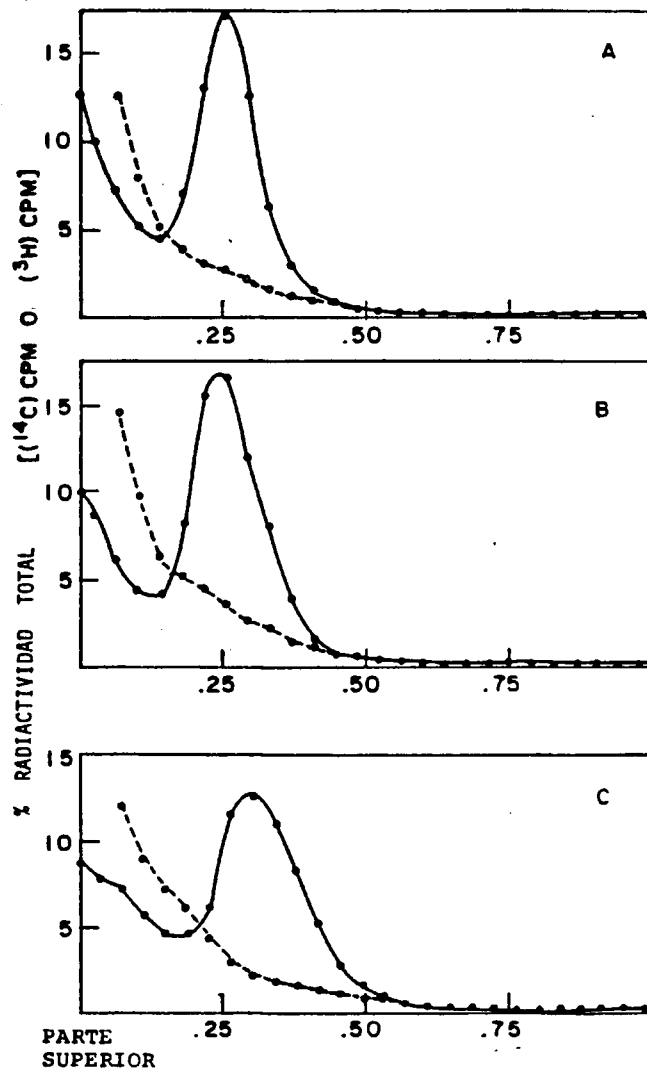
El cultivo celular se marcó radioactivamente con  $^{14}\text{C}$ -timidina y  $^3\text{H}$ -leucina durante el crecimiento hasta su fase exponencial según se describe en Materiales y Métodos; posteriormente las células fueron recolectadas mediante centrifugación y suspendidas en el mismo medio de cultivo, ahora sin material radioactivo. Alicuotas (0.1 ml) de la suspensión celular se transfirieron (temperatura ambiente) a tubos de vidrio (12 x 75 mm) en donde sufrieron un calentamiento a 50°C en un baño de agua. Después del tratamiento térmico las células permanecieron dos minutos a temperatura ambiente antes de comenzar el tratamiento para la obtención de sus nucleoides. El lisado celular con los nucleoides se centrifugó a 4°C y 4000 rpm en gradientes neutros de sacarosa (10 - 50%) hasta un total ( $\omega^2 t$ ) de  $6 \times 10^9 \text{ rad}^2/\text{seg}$ .

- A: Control. Células no calentadas ( $^{14}\text{C}=16570 \text{ CPM}$ ;  $^3\text{H}=390980 \text{ CPM}$ ).
- B: 50°C, 2 min. ( $^{14}\text{C}=19062 \text{ CPM}$ ;  $^3\text{H}=450269 \text{ CPM}$ ).
- C: 50°C, 4 min. ( $^{14}\text{C}=17692 \text{ CPM}$ ;  $^3\text{H}=408566 \text{ CPM}$ ).
- D: 50°C, 6 min. ( $^{14}\text{C}=17232 \text{ CPM}$ ;  $^3\text{H}=415349 \text{ CPM}$ ).
- E: 50°C, 8 min. ( $^{14}\text{C}=15721 \text{ CPM}$ ;  $^3\text{H}=402675 \text{ CPM}$ ).
- F: 50°C, 10 min. ( $^{14}\text{C}=15315 \text{ CPM}$ ;  $^3\text{H}=371879 \text{ CPM}$ ).

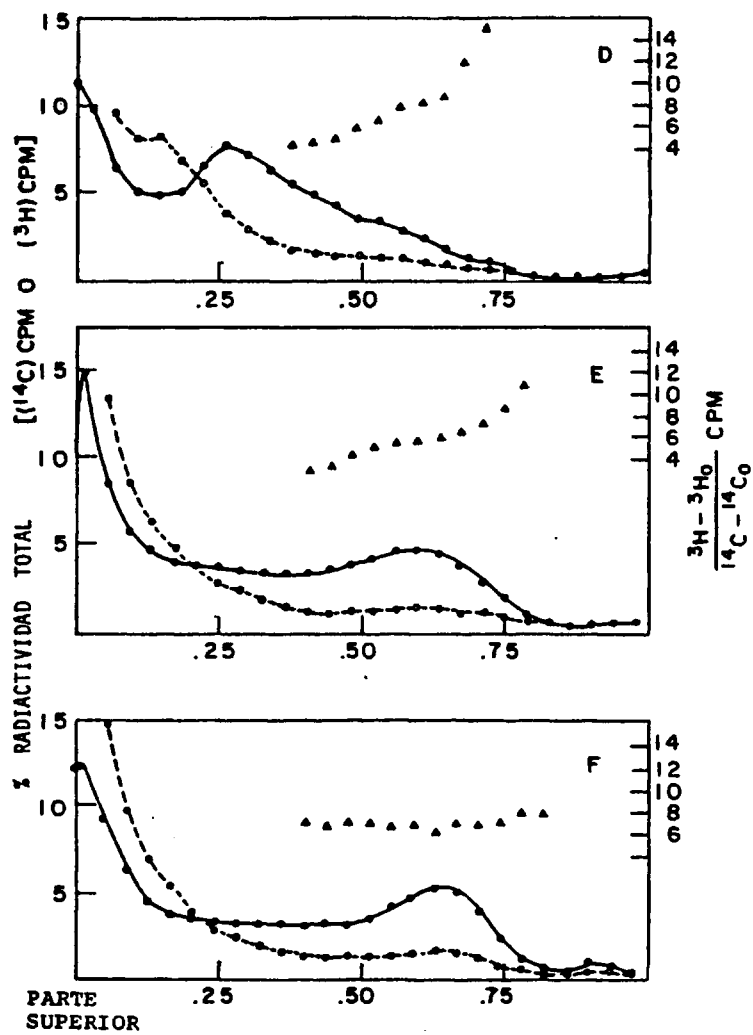
En los perfiles D, E Y F, los triángulos ( ) representan el cociente ( $\text{CPM}$ )  $\frac{^3\text{H} - ^3\text{H}_0}{^{14}\text{C} - ^{14}\text{C}_0}$  en cada una de las fracciones.

$^{14}\text{C}_0$  y  $^3\text{H}_0$  son las CPM en las mismas fracciones de los perfiles de las células sin calentar (A).

● —●  $^{14}\text{C}$ -timidina. ○ ——— ○  $^3\text{H}$ -leucine.



SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL





un perfil continuo desde 0 hasta, aproximadamente, 5000 S, con un pico a 4500 S. Este último perfil ocurre después de calentar las células a 50°C durante 10 minutos (Figura 4-F). El cociente leucina/timidina (relación entre el DNA y la proteína en cada fracción) muestra que en los nucleoides de células calentadas durante 6 y 8 minutos hay una mayor cantidad de proteína por unidad de DNA a medida que el coeficiente de sedimentación aumenta. En los nucleoides de células calentadas durante 10 minutos, el coeficiente leucina/timidina es similar para los nucleoides con coeficientes de sedimentación muy diferentes (desde 3000 S hasta aproximadamente 5000 S) (Figuras 4-D, E y F).

El efecto fué el enfriamiento de las células antes y después del tratamiento térmico tiene en sus nucleoides se observa en la Figura 5. El método experimental fué el mismo empleado en la Figura 4 pero esta vez las células fueron enfriadas en un baño de agua y hielo a 0°C inmediatamente antes y después del tratamiento térmico. Cuando se emplearon tiempos de calentamiento cortos (2 y 4 minutos), el coeficiente de sedimentación de los nucleoides disminuyó hasta, aproximadamente, 1200 S y desde este valor comenzó de nuevo a incrementarse, como en la Figura 4, pero sin llegar a alcanzar un coeficiente de sedimentación tan alto y con más tendencia a agregarse (por ejemplo, Figura 5-C). Los picos que comprenden una fracción solamente, en estos perfiles de sedimentación, son debidos a la agregación de nucleoides como se demuestra lisando células calentadas y sin calentar al mismo tiempo; las agregaciones, cuando ocurren, incluyen ambas clases de nucleoides. En las Figuras

FIGURA 5: PERFILES DE SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES  
 PROCEDENTES DE CELULAS CALENTADAS (0 - 10 MIN  
 A 50°C) Y POSTERIORMENTE ENFRIADAS A 0°C.

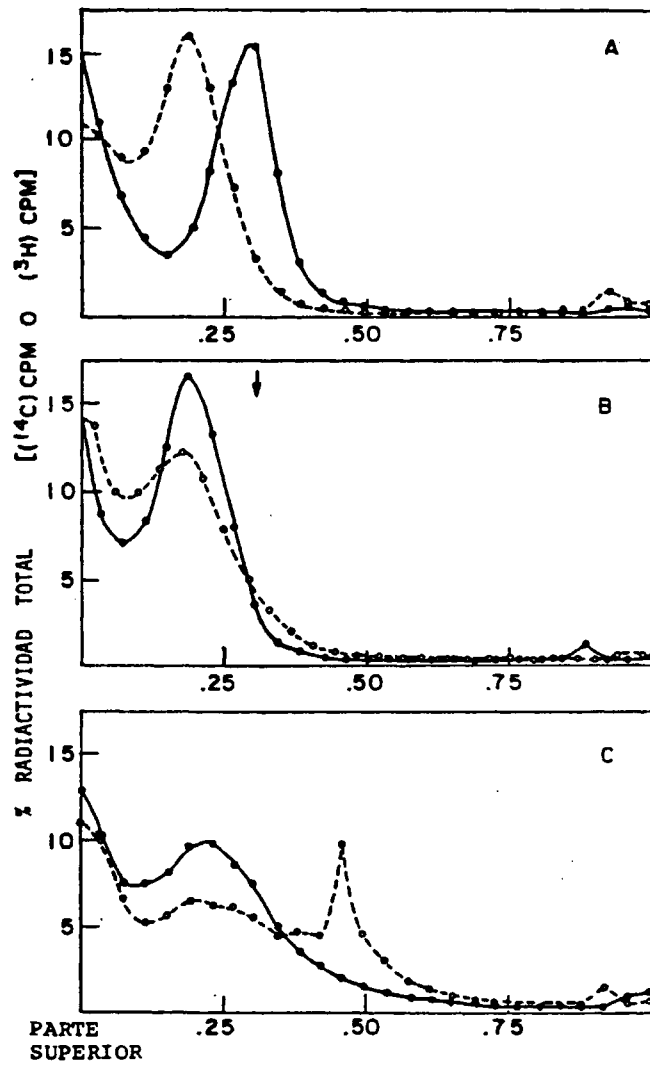
El procedimiento experimental fué similar al descrito en la Figura 4, excepto que en este caso solo se realizó el marcaje radiactivo con  $^{14}\text{C}$ -timidina y que la suspensión celular se enfrió a 0°C en un baño de hielo y agua inmediatamente antes y después del tratamiento térmico.

A: ● ——— ● Células no calentadas ( $^{14}\text{C}$ =16007 CPM)  
 O ----- O 50°C, 2 min ( $^{14}\text{C}$ =15600 CPM)

B: ● ——— ● 50°C, 4 min ( $^{14}\text{C}$ =18821 CPM)  
 O ----- O 50°C, 6 min ( $^{14}\text{C}$ =17096 CPM)

C: ● ——— ● 50°C, 8 min ( $^{14}\text{C}$ =17274 CPM)  
 O ----- O 50°C, 10 min ( $^{14}\text{C}$ =16934 CPM)

La flecha indica la posición de los nucleoides procedentes de células sin calentar.



SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL

4 y 5 no hubo ninguna diferencia significativa entre los diferentes perfiles de sedimentación en cuanto a radioactividad total recuperada o radioactividad en las fracciones de la parte superior de los gradientes.

Tratando térmicamente a las células durante períodos de tiempo mayores (15, 30 y 60 minutos a 50°C) sin posterior enfriamiento, podemos observar (Figura 6) que los perfiles de sedimentación de sus nucleoides no son diferentes básicamente de los procedentes de células calentadas durante 10 minutos (Figura 4-F) cuando la velocidad de centrifugación era 4000 rpm. El pico pequeño que aparece en el fondo de los perfiles de sedimentación aumenta con el tiempo de calentamiento.

En la Figura 7, el experimento fué similar al de la Figura 6 pero a una velocidad de centrifugación de 7000 rpm. El cambio en la velocidad de centrifugación origina perfiles de sedimentación diferentes y el coeficiente de sedimentación de los nucleoides tiende a ser progresivamente menor, con picos cada vez más agudos cuando el tiempo de calentamiento vá de 15 a 60 minutos a 50°C. La radioactividad total recuperada de las células calentadas de 15 a 60 minutos no mostró diferencias significativas.

Después de un calentamiento a 50°C durante 120 minutos (Figura 8), el perfil de sedimentación de los nucleoides resultó ser un continuo hasta el fondo de los gradientes, aumentando el pico que se encontraba en esa posición; además, en las fracciones de la parte superior de los gradientes (correspondientes a coeficientes de sedimentación menores) hay más material radioactivo que en los gra-

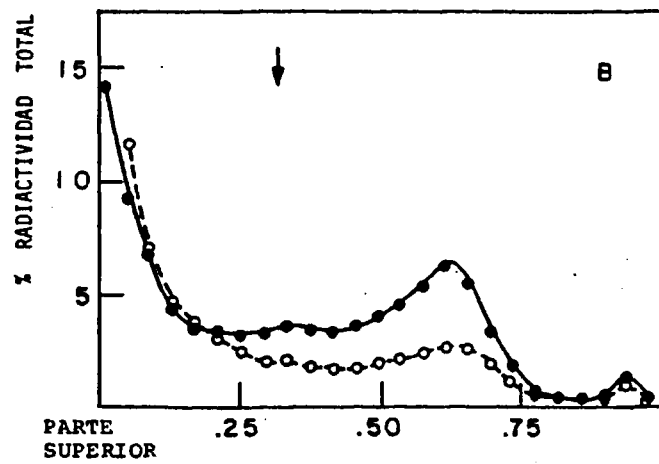
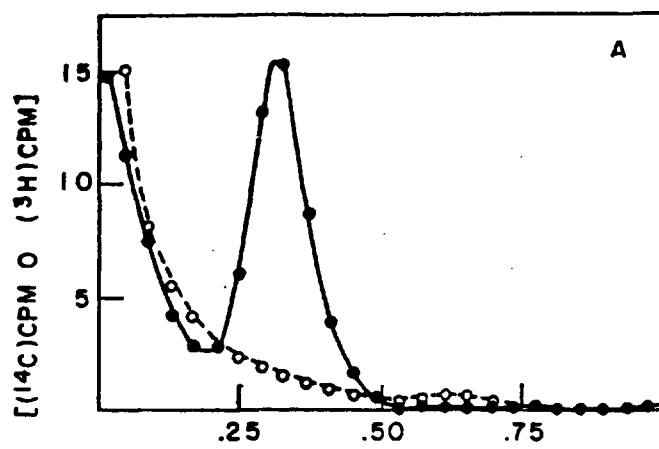
FIGURA 6: PERFILES SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES PROCEDENTES DE CELULAS CALENTADAS (15 - 60 MIN A 50°C)

Los cultivos se marcaron radiactivamente con  $^{14}\text{C}$ -timidina y  $^3\text{H}$ -leucina hasta su fase exponencial, entonces se transfirieron a un baño a 50°C y, sin enfriamiento posterior, se recolectaron mediante centrifugación. Las células fueron lisadas y los lisados centrifugados a 4°C y 4000 rpm en gradientes neutros de sacarosa hasta un total ( $\omega^2 t$ ) de  $6 \times 10^9 \text{ rad}^2/\text{seg}$ .

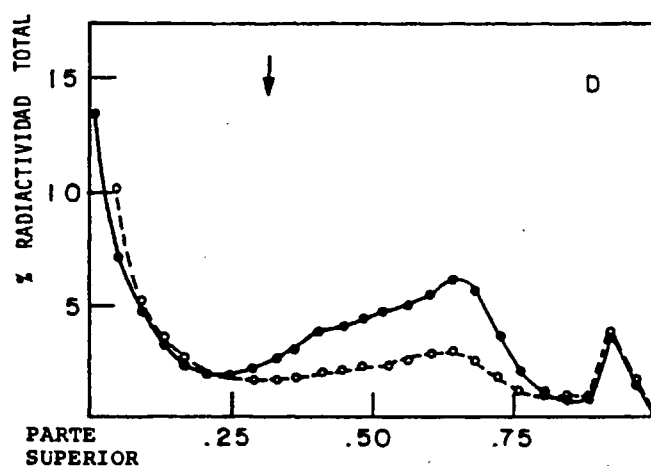
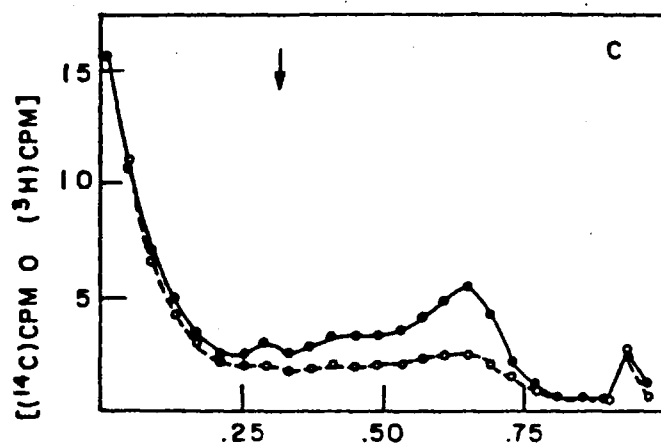
- A: Células no calentadas ( $^{14}\text{C}=6418 \text{ CPM}$ ;  $^3\text{H}=135241 \text{ CPM}$ )  
 B: 50°C, 15 min ( $^{14}\text{C}=9412 \text{ CPM}$ ;  $^3\text{H}=210885 \text{ CPM}$ )  
 C: 50°C, 30 min ( $^{14}\text{C}=7718 \text{ CPM}$ ;  $^3\text{H}=173114 \text{ CPM}$ )  
 D: 50°C, 60 min ( $^{14}\text{C}=6861 \text{ CPM}$ ;  $^3\text{H}=182208 \text{ CPM}$ )

Las flechas en B, C y D indican la posición de los nucleoides procedentes de células sin calentar.

● ——— ●  $^{14}\text{C}$ -timidina  
 O ----- O  $^3\text{H}$ -leucina



SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL



SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL

FIGURA 7: PERFILES DE SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES  
 PROCEDENTES DE CELULAS CALENTADAS (15 - 60 MIN  
 A 50°C). CENTRIFUGACION A 7000 RPM.

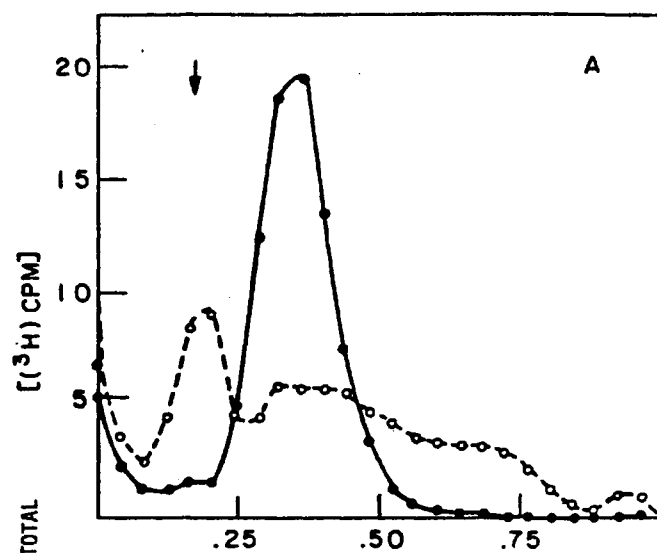
Los cultivos se marcaron radiactivamente con  $^3\text{H}$ -timidina; el resto del procedimiento experimental fué el mismo descrito en la Figura 6 excepto la velocidad de centrifugación de los lisados en los gradientes de sacarosa, que fué en este caso de 7000 rpm hasta un total ( $\omega^2 t$ ) de  $6 \times 10^9 \text{ rad}^2/\text{seg}$ .

A: ● ——— ● Células no calentadas ( $^3\text{H}$ =75054 CPM)  
 O ----- O 50°C, 15 min ( $^3\text{H}$ =78319 CPM)

B: ● ——— ● 50°C, 30 min ( $^3\text{H}$ =78656 CPM)  
 O ----- O 50°C, 60 min ( $^3\text{H}$ =72257 CPM)

Las flechas en la parte superior izquierda indican la posición del fago T4 empleado como control (1025 S). La flecha de la derecha en B indica la posición de los nucleoides de células sin calentar.

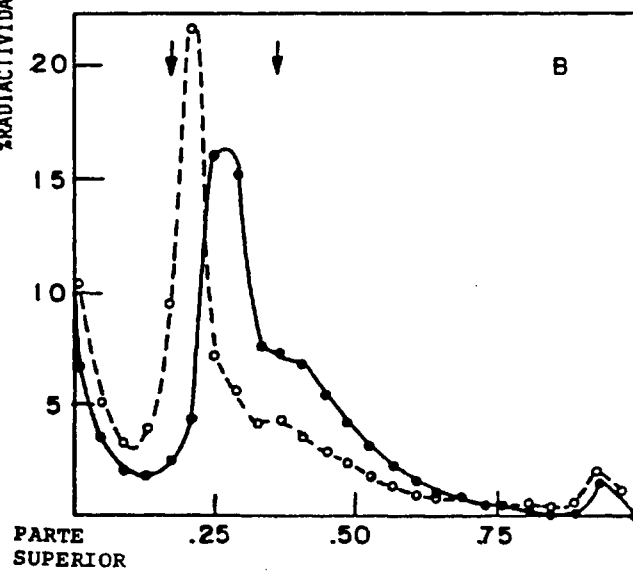




TOTAL

%RADIATIVIDAD

PARTE SUPERIOR

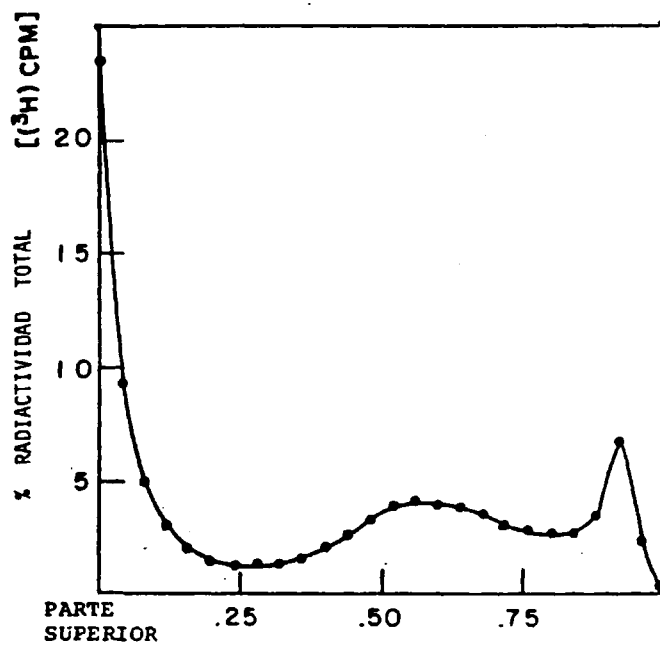


SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL

FIGURA 8: PERFIL DE SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES  
PROCEDENTES DE CELULAS CALENTADAS A 50°C DURANTE  
120 MIN.

El cultivo se marcó radiactivamente con  $^3\text{H}$ -timidina. El resto del procedimiento experimental es similar al empleado en la Figura 6.

● ——— ●  $^3\text{H}$ -timidina (22770 CPM)



SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL

dientes vistos hasta ahora. En otros experimentos, no incluidos en esta tesis, empleando el mismo tiempo de calentamiento (120 minutos) se observaron picos consistentes de una fracción solamente debidos a agregación de los nucleoides.

B. Propiedades de los nucleoides tratados térmicamente  
in vivo

Para marcar los fosfolípidos de la membrana se utilizó  $^3\text{H}$ -glicerol (Korch et al., 1976) y una técnica de lisis diferente a la empleada hasta ahora. Este nuevo tratamiento da lugar simultáneamente a nucleoides libres de membrana y a nucleoides asociados con membrana, ambos a partir de células no tratadas térmicamente (Figura 9-A). Así se pudo determinar que los nucleoides asociados con proteína procedentes de células calentadas y obtenidos empleando la técnica normal, no contenían fosfolípidos de membrana (Figura 9-B). Cuando las células calentadas se lisaron con la técnica empleada en la Figura 9-A (sin Sarkosyl), el perfil de sedimentación varió ostensiblemente con un pico ahora a 6000 S aproximadamente (nucleoides asociados con membrana y proteína).

Para determinar la proporción relativa de proteína a DNA en los nucleoides asociados con membrana (control) y en los nucleoides libres de membrana (procedentes de células calentadas) las células se marcaron simultáneamente con  $^{14}\text{C}$ -timidina y con  $^3\text{H}$ -leucina (Figura 10). Las células no calentadas fueron sometidas a dos tratamientos de lisis diferentes: 10-A: Técnica normal para obtener nucleoides libres de membrana; 10-C: Técnica de lisis que da

FIGURA 9: PERFILES DE SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES ASOCIADOS CON MEMBRANA, LIBRES Y PROCEDENTES DE CELULAS CALENTADAS.

- A: El método empleado en la lisis celular da lugar a nucleoides libres y a nucleoides asociados con membrana celular en el mismo perfil de sedimentación. La solución B se añadió a la suspensión celular (células no calentadas) y después de 6 minutos a 0°C se añadió la solución C' (sin sarkosyl). ( $^{14}\text{C}$ =21914 CPM;  $^3\text{H}$ =92663 CPM).
- B: Células calentadas (50°C, 30 minutos). El procedimiento experimental para la obtención de nucleoides es el normal descrito en Materiales y Métodos. ( $^{14}\text{C}$ =19640 CPM;  $^3\text{H}$ =70404 CPM).
- C: Células calentadas (50°C, 30 min). El procedimiento de lisis fue el mismo empleado en A. ( $^{14}\text{C}$ =17301 CPM;  $^3\text{H}$ =63193 CPM).

En todos los casos la centrifugación se llevó a cabo a 4000 rpm.

● ——— ●  $^{14}\text{C}$ -timidina. O ——— O  $^3\text{H}$ -glicerol

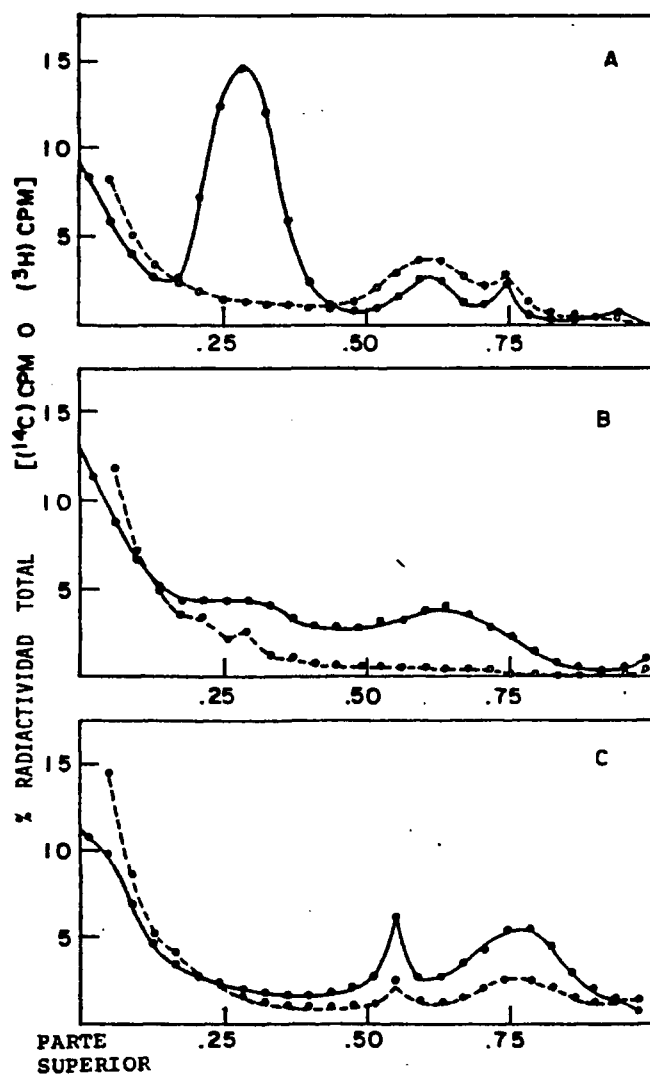
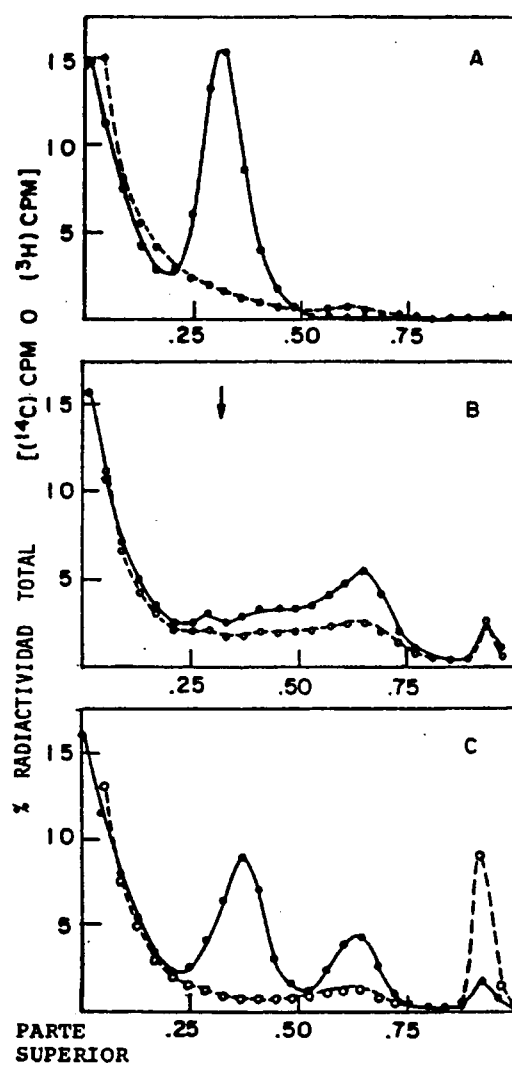


FIGURA 10: COMPARACION DE LOS PERFILES DE SEDIMENTACION DE DNA Y PROTEINA ENTRE LOS NUCLEOIDES LIBRES DE MEMBRANA CELULAR Y ASOCIADOS A LA MISMA Y LOS NUCLEOIDES DE CELULAS CALENTADAS.

- A: Nucleoides de células no calentadas. ( $^{14}\text{C}$ =6418 CPM;  $^3\text{H}$ =135241 CPM).
- B: Nucleoides de células calentadas (50°C, 30 min). ( $^{14}\text{C}$ =7781 CPM;  $^3\text{H}$ =173114 CPM).
- C: Células no calentadas. El procedimiento de lisis empleado da lugar a nucleoides libres de membrana y a nucleoides asociados a la misma en el mismo perfil de sedimentación. La solución B se añadió a la suspensión celular y después de 3 minutos a 0°C se añadió la solución C' (sin sarkosyl). ( $^{14}\text{C}$ =5765 CPM;  $^3\text{H}$ =120340 CPM)

La centrifugación de los lisados se llevó a cabo a 4000 rpm.

● ——— ●  $^{14}\text{C}$ -timidina. O ——— O  $^3\text{H}$ -leucina.



SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL



lugar simultáneamente a nucleoides libres y nucleoides asociados con membrana. Las células calentadas (10-B) se lisaron empleando la técnica normal. Los coeficientes  $^3\text{H}$ -leucina/ $^{14}\text{C}$ -timidina (cpm) se observan en la Tabla 3.

Para el mismo coeficiente de sedimentación (misma fracción), la cantidad de proteína asociada con los nucleoides es mayor en los nucleoides asociados con proteína procedentes de células calentadas, que en los nucleoides asociados con membrana procedente de células sin calentar (fracciones 16-19 en Figuras 10-B y 10-C).

La dependencia del perfil de sedimentación de los nucleoides calentados en la velocidad de centrifugación se puede observar en las Figuras 11 y 12. El perfil continuo observado a 4000 rpm (Figura 9-B) pasó a ser un pico a aproximadamente 5500 S cuando la centrifugación de los gradientes se llevó a cabo a 3700 rpm y 3000 rpm (Figuras 11-B y 12-A). Cuando la velocidad de centrifugación se aumentó a 6000 rpm, el coeficiente de sedimentación medio decreció (Figura 12-C), pero todavía había nucleoides sedimentando desde 2000 S hasta 5500 S.

Los nucleoides asociados con membrana y proteína procedentes de células calentadas (Figura 9-C) resultaron ser poco dependientes en la velocidad de centrifugación a 4000 rpm, 3700 rpm y 3000 rpm (Figuras 9-C, 11-C y 12-B) pero eran extremadamente dependientes a velocidades de centrifugación mayores de 4000 rpm (por ejemplo a 6000 rpm, Figura 12-D). El efecto de la velocidad de centrifugación en los nucleoides calentados in vivo, empleando un amplio rango de velocidades, se observa en la Figura 13. Las células fueron calen-

TABLA III

COCIENTES LEUCINA/TIMIDINA EN LOS NUCLEOIDES DE  
CELULAS CALENTADAS Y SIN CALENTAR.

Fracción	COCIENTE $\frac{{}^3\text{H-leucina}}{{}^{14}\text{C-timidina}}$ (CPM)	
	Sin Calentar	50°C, 30 Min
16	8.9	11.9
17	7.0	11.2
18	6.0	10.2
19	6.6	11.4

FIGURA 11: PERFILES DE SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES SIN CALENTAR; NUCLEOIDES CALENTADOS Y CON PROTEINA ASOCIADA Y NUCLEOIDES CALENTADOS Y ASOCIADOS CON MEMBRANA. CENTRIFUGACION A 3700 RPM.

- A: Células no calentadas. El procedimiento de lisis es el mismo empleado en la Figura 9-A. ( $^{14}\text{C}$ =26434 CPM;  $^3\text{H}$ =958577 CPM).
- B: Células calentadas (50°C, 30 min). Procedimiento normal de obtención de nucleoides. ( $^{14}\text{C}$ =21893 CPM;  $^3\text{H}$ =532219 CPM).
- C: Células calentadas (50°C, 30 min). El procedimiento de lisis es el mismo empleado en A. ( $^{14}\text{C}$ =21907 CPM;  $^3\text{H}$ =519941 CPM).

La centrifugación de los lisados se llevó a cabo a 3700 rpm.

● ——— ●  $^{14}\text{C}$ -timidina. O ----- O  $^3\text{H}$ -leucina.

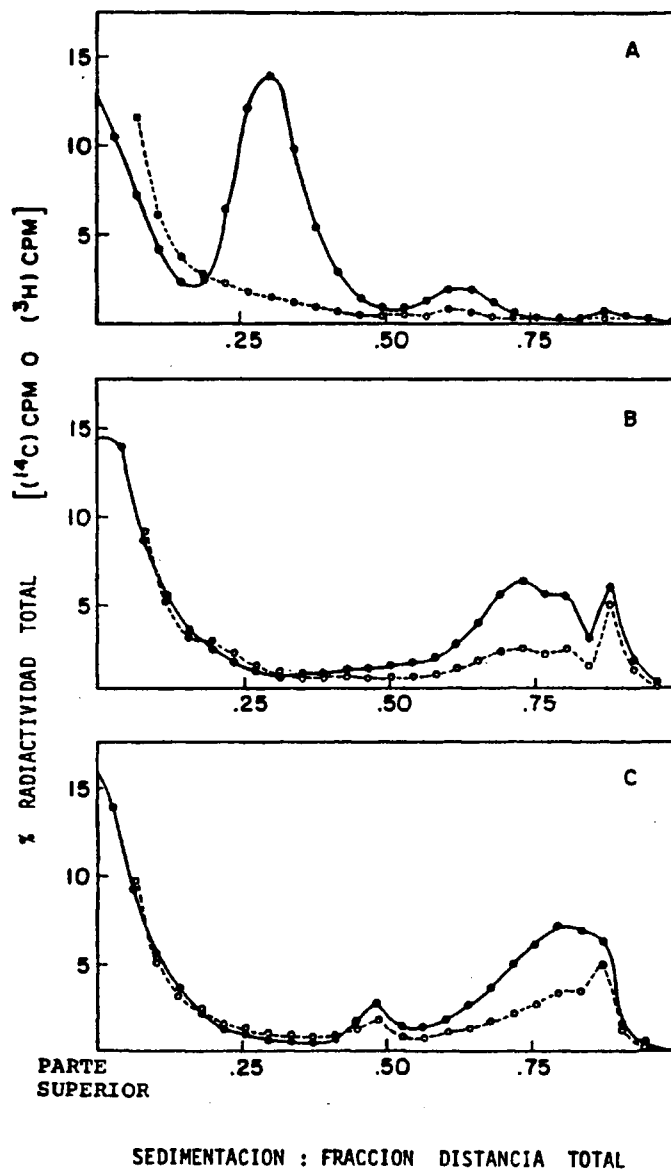


FIGURA 12: PERFILES DE SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES CALENTADOS Y CON PROTEINA ASOCIADA Y NUCLEOIDES CALENTADOS Y ASOCIADOS CON MEMBRANA. CENTRIFUGACION A 3000 RPM.

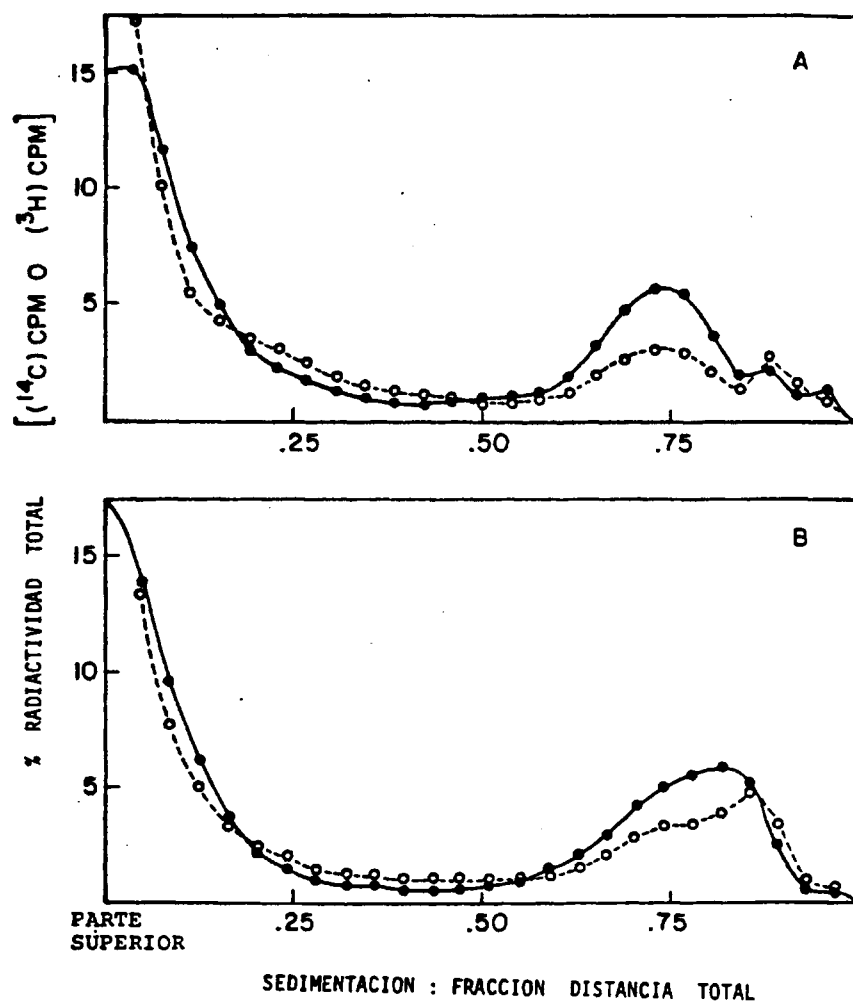
A y C: Células calentadas (50°C, 30 min). Procedimiento normal de obtención de nucleoides.

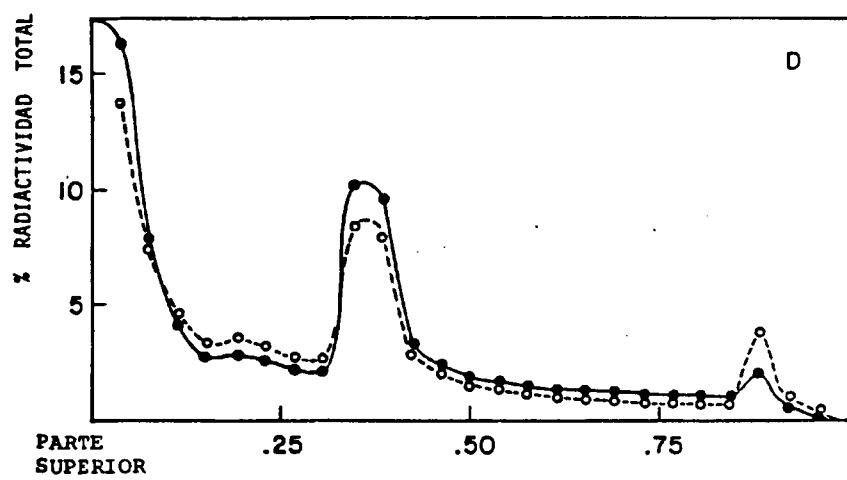
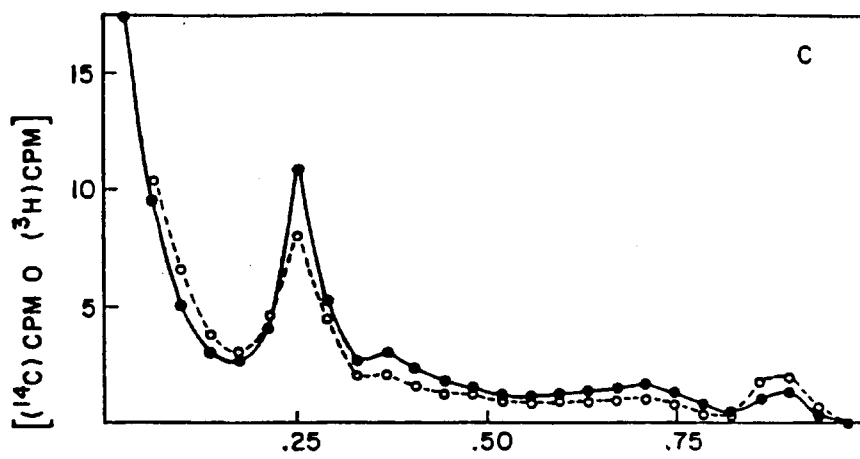
B y D: Células calentadas (50°C, 30 min). El procedimiento de lisis es el mismo empleado en la Figura 9-A.

La centrifugación de los lisados se llevó a cabo a 3000 rpm (A y B) y a 6000 rpm (C y D) hasta un total ( $\omega^2 t$ ) de  $6 \times 10^9 \text{ rad}^2/\text{seg}$ .

- A. ( $^{14}\text{C}$ =31035 CPM;  $^3\text{H}$ =475837 CPM)
- B. ( $^{14}\text{C}$ =27167 CPM;  $^3\text{H}$ =401344 CPM)
- C. ( $^{14}\text{C}$ =32159 CPM;  $^3\text{H}$ =473327 CPM)
- D. ( $^{14}\text{C}$ =28843 CPM;  $^3\text{H}$ =416015 CPM)

● ——— ●  $^{14}\text{C}$ -timidina. O ——— O  $^3\text{H}$ -leucina.





SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL

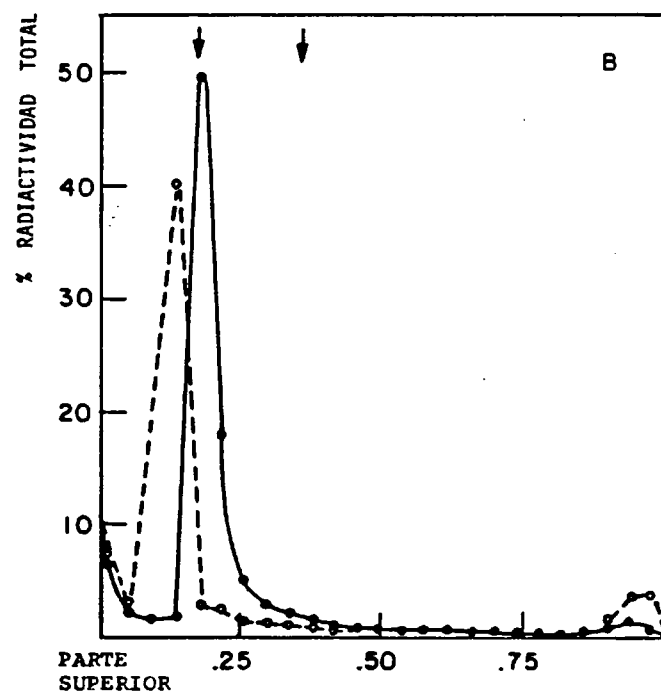
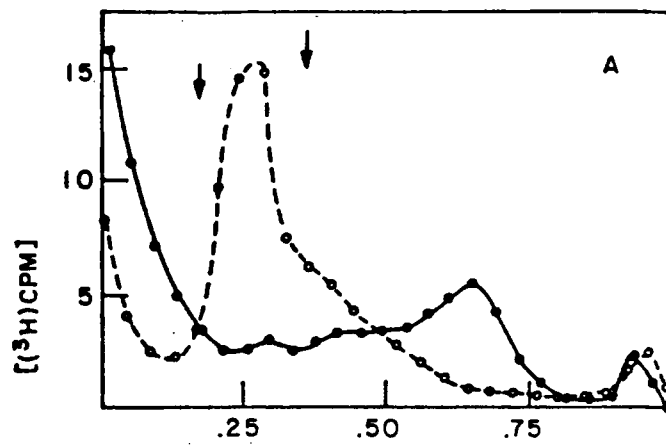
**FIGURA 13: PERFILES DE SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES CALENTADOS SOMETIDOS A DISTINTAS VELOCIDADES DE CENTRIFUGACION.**

Los cultivos se marcaron con  $^3\text{H}$ -timidina exclusivamente. La centrifugación de los lisados se llevó a cabo a distintas velocidades hasta un total ( $\omega^2 t$ ) de  $6 \times 10^9 \text{ rad}^2/\text{seg}$ .

- A: ● ——— ● Centrifugación a 4000 rpm (Ver Figura 5)  
 O ----- O Centrifugación a 7000 rpm ( $^3\text{H}=70681 \text{ CPM}$ )
- B: ● ——— ● Centrifugación a 17000 rpm ( $^3\text{H}=78518 \text{ CPM}$ )  
 O ----- O Centrifugación a 30000 rpm ( $^3\text{H}=53575 \text{ CPM}$ )

Las flechas de la izquierda indican la posición del fago T-4 (1025 S); las de la derecha la posición de los nucleoides procedentes de células sin calentar.





SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL

tadas a 50°C durante 30 minutos y sus nucleoides se centrifugaron a distintas velocidades. Los perfiles de sedimentación mostraron una disminución muy rápida del coeficiente de sedimentación a medida que la velocidad de centrifugación aumentaba de 4000 rpm a 7000 rpm (el pico principal pasó de 4500 S a 1500 S). A 17000 rpm y 30000 rpm el perfil de sedimentación mostró picos muy agudos (una fracción a 1000 S y 800 S, que indicaban agregación a estas velocidades).

Los nucleoides calentados ( $^{14}\text{C}$ -timidina) no interaccionaban con los no-tratados ( $^3\text{H}$ -timidina) cuando la lisis de células calentadas y sin calentar se llevaba a cabo simultáneamente (Figura 14).

### C. Reparación después del daño térmico

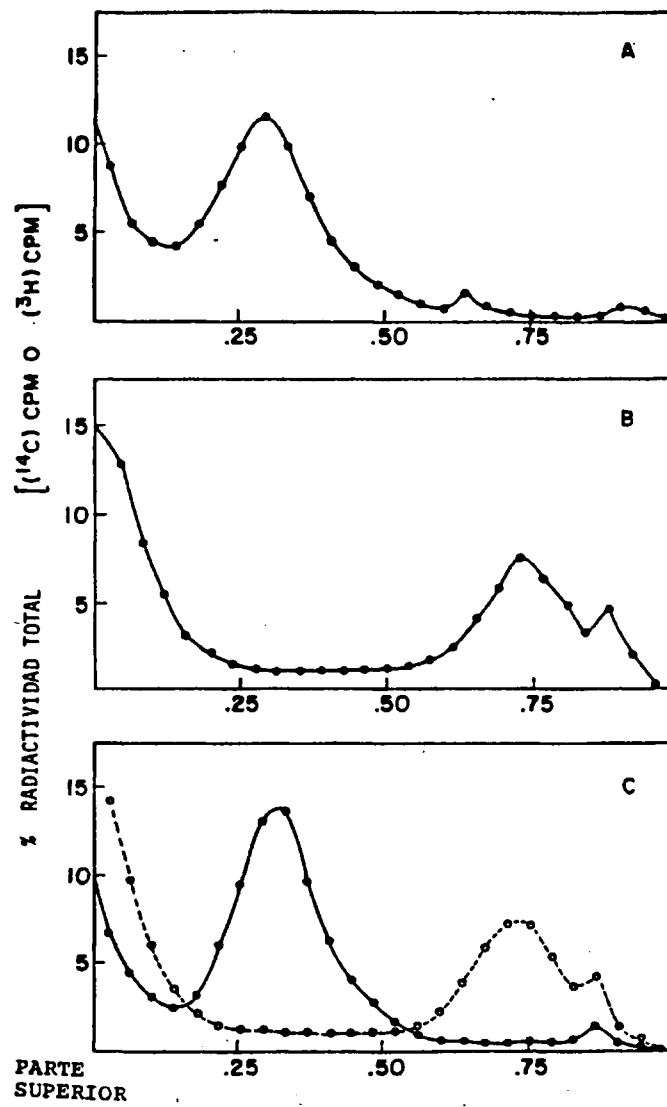
#### 1. Demostración de la injuria térmica y su reparación.

El proceso de reparación de la injuria térmica se observa en la Figura 15. Un cultivo en fase exponencial se trató térmicamente a 50°C durante 120 minutos y después se dividió en dos alícuotas cuyas células fueron recolectadas separadamente por centrifugación y lavadas una vez, en el medio químico definido. Una alícuota se resuspendió en el medio químico definido y la otra en el mismo medio pero sin ninguno de los 5 aminoácidos que nuestra cepa requiere. Ambas se incubaron posteriormente a 37°C para observar el incremento en el número de células capaces de formar colonias en Agar Luria. Después del calentamiento hubo un incremento inicial en el número de colonias formadas que se completó en 3-4 horas. Este incremento (de  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  células viables por ml) indica el número de células

FIGURA 14: PERFILES DE SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES OBTENIDOS AL LISAR SIMULTANEAMENTE CELULAS CALENTADAS Y SIN CALENTAR.

- A: Células sin calentar marcadas con  $^3\text{H}$ -timidina. ( $^3\text{H}$ =515912 CPM).
- B: Células calentadas (50°C, 30 min) marcadas con  $^{14}\text{C}$ -timidina. ( $^{14}\text{C}$ =21039 CPM).
- C: Mezcla de células calentadas y sin calentar lisadas simultaneamente. ( $^{14}\text{C}$ =10577 CPM;  $^3\text{H}$ =261281 CPM).
- ——— ●  $^3\text{H}$ -timidina. ○ ——— ○  $^{14}\text{C}$ -timidina.

La centrifugación de los lisados se llevó a cabo a 3700 rpm.



SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL

## FIGURA 15: INJURIA TERMICA Y SU REPARACION

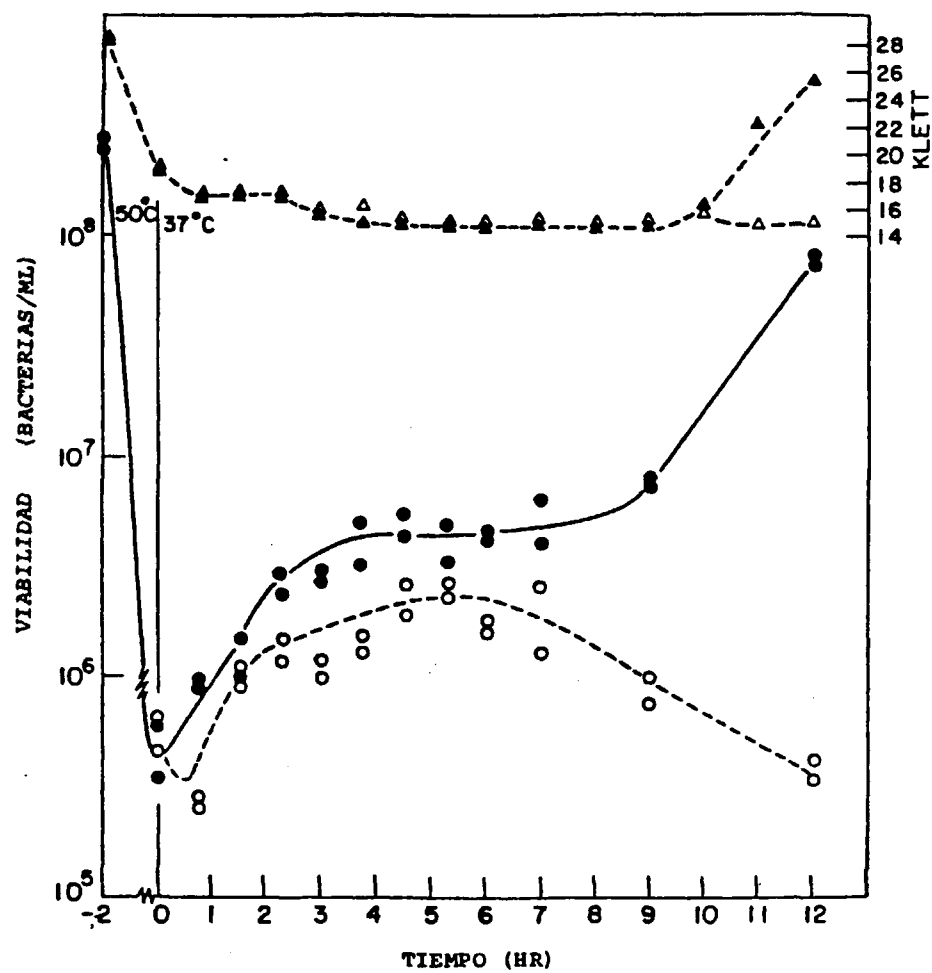
El cultivo creció hasta la fase exponencial y después se transfirió a un baño a 50°C durante 120 minutos. La mitad del cultivo se recolectó mediante centrifugación y el sedimento fue suspendido en el mismo medio de cultivo e incubado a 37°C. La otra mitad se recolectó mediante centrifugación y, después de lavar el sedimento una vez con el mismo medio de cultivo sin aminoácidos, se volvió a recolectar y a resuspender en el medio de cultivo sin ninguno de los 5 aminoácidos requeridos por el microorganismo. Esta suspensión celular se incubó igualmente a 37°C.

Después de diferentes periodos de tiempo se tomaron alícuotas de los cultivos y tras las diluciones correspondientes en buffer fosfato, se realizaron los recuentos por duplicado en placas de Agar Luria (incubación durante 48 horas a 37°C).

Las unidades Klett ( $\blacktriangle$ ---- $\blacktriangle$ : en medio con aminoácidos;  $\triangle$ ---- $\triangle$ : en medio sin aminoácidos) representan la absorbancia a 660 nm en un colorímetro Klett-Summerson.

● ——— ● Medio de cultivo normal.

O ----- O Medio de cultivo sin los 5 aminoácidos que el microorganismo requiere.



que sufrieron la injuria térmica y fueron capaces de reparar el daño térmico en estas 3 a 4 horas. El incremento no fué debido al crecimiento y la división celular puesto que los microorganismos incubados en el medio sin aminoácidos mostraron un incremento paralelo. De 4 a 9 horas se observa un plateau y después de 9 horas a 37°C las células empezaron a crecer y dividirse en el medio completo con un descenso concomitante en el número de células, incubadas en el medio sin aminoácidos, capaces de formar colonias. El momento en el que se reanuda la división celular (9 horas a 37°C) quedó también indicado por el aumento en la absorbancia a 660 nm (Klett).

La injuria térmica producida después de un tratamiento a 50°C durante 30 minutos y la subsiguiente reparación a 37°C quedan ilustradas en la Figura 16. El número de células que sufrieron daño térmico fué aproximadamente 90% del número inicial y el 50% de éstas fueron capaces de reparar a 37°C en 4 horas. Después de 4 horas, las células empezaron a crecer y dividirse. La absorbancia a 660 nm aumentó con este nuevo crecimiento celular.

Los perfiles de sedimentación de los nucleoides de estas células se observan en la Figura 17. Las células fueron marcadas radioactivamente, calentadas a 50°C durante 30 minutos, recolectadas, resuspendidas en el mismo medio sin precursores radioactivos e incubadas a 37°C durante distintos periodos de tiempo. Después de 1 hora a 37°C (Figura 17-C) el pico a 4750 S típico de nucleoides calentados a 50°C durante 30 minutos (Figura 17-B) cambió a 5500 S y los nucleoides con coeficientes de sedimentación intermedios empezaron a acumularse en este pico. También aumentó el pico en el fondo de

FIGURA 16: INJURIA TERMICA Y SU REPARACION DESPUES DE UN TRATAMIENTO TERMICO A 50°C DURANTE 30 MIN.

El cultivo en fase exponencial se transfirió de 37°C a 50°C durante 30 minutos, se recolectó mediante centrifugación y el sedimento fué resuspendido en el mismo medio de cultivo e incubado a 37°C. Durante la incubación se tomaron alicuotas periódicamente y tras las correspondientes diluciones en bufer fosfato, se realizaron los recuentos por duplicado en placas de Agar Luria (incubación durante 48 horas a 37°C).

Las unidades Klett (▲ ---- ▲) representan la absorbancia a 660 nm medida en un colorímetro Klett-Summerson.

● ——— ● Células viables en Agar Luria.



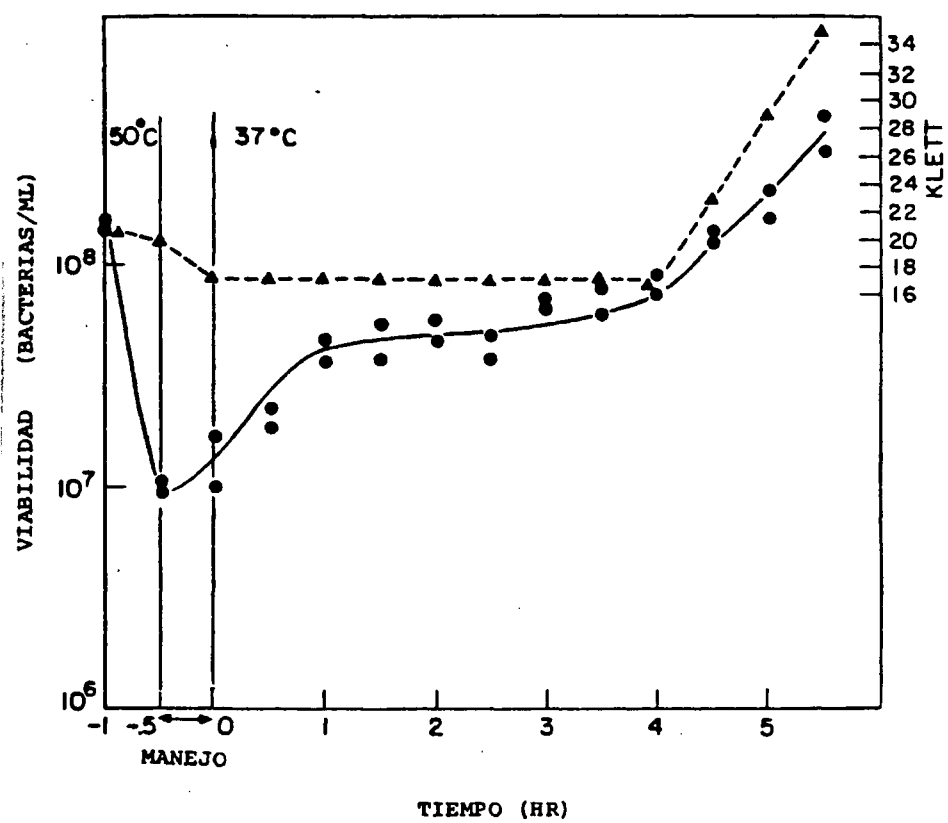


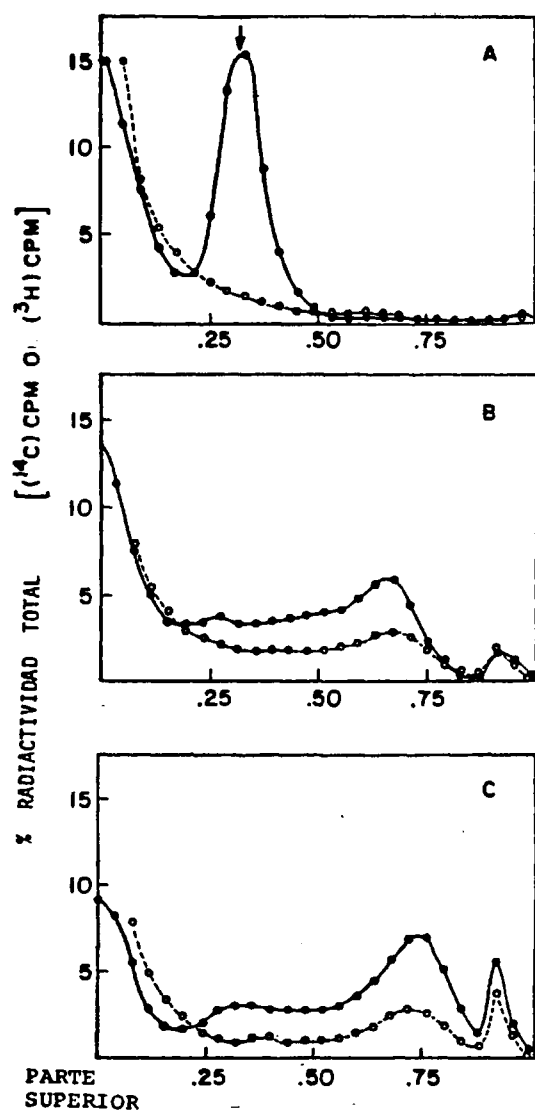
FIGURA 17: PERFILES DE SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES  
PROCEDENTES DE LAS CELULAS SUFRIENDO INJURIA  
TERMICA (50°C, 30 MIN) Y SU REPARACION

Un Cultivo celular en fase exponencial y marcado con  $^{14}\text{C}$ -timidina y  $^3\text{H}$ -leucina fué calentado a 50°C durante 30 minutos, fué recolectado, resuspendido en el mismo medio de cultivo sin radiactividad e incubado a 37°C. Durante la incubación se tomaron alicuotas periodicamente, se recolectaron las células mediante centrifugación, y se procedió a su lisis para la obtención de nucleoides. La centrifugación de los lisados se llevó a cabo a 4000 rpm hasta un total ( $\omega^2 t$ ) de  $6 \times 10^9 \text{ rad}^2/\text{seg}$  de la forma indicada en Materiales y Métodos.

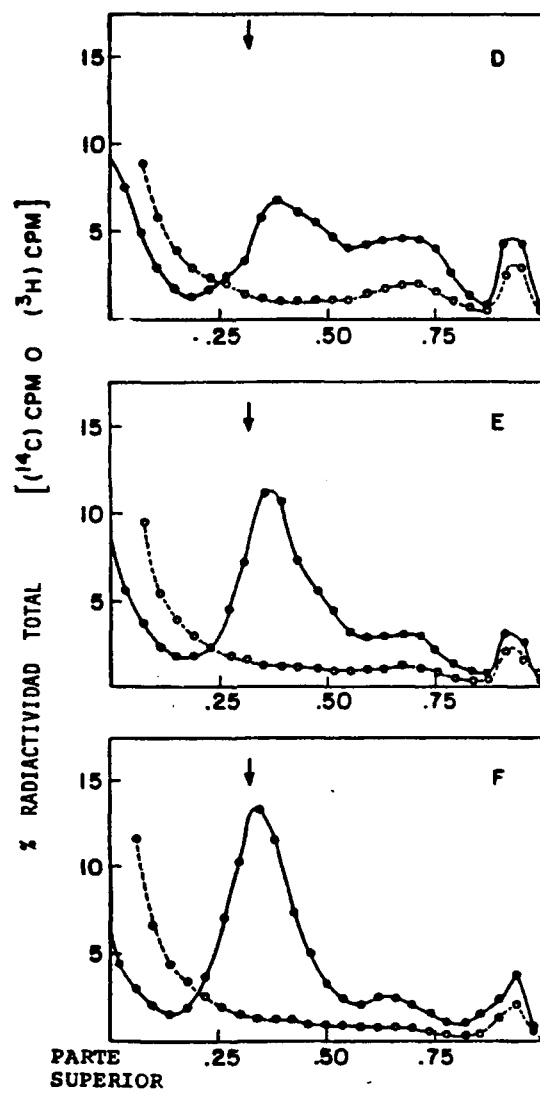
- A: Células no calentadas (19 Klett)
- B: 50°C, 30 minutos ( $^{14}\text{C}$ =11199 CPM;  $^3\text{H}$ =194379 CPM) (19 Klett)
- C: 50°C, 30 minutos + 37°C, 60 minutos.  
( $^{14}\text{C}$ =7447 CPM;  $^3\text{H}$ =146011 CPM) (15 Klett)
- D: 50°C, 30 minutos + 37°C, 120 minutos  
( $^{14}\text{C}$ =8069 CPM;  $^3\text{H}$ =164079 CPM) (15 Klett)
- E: 50°C, 30 minutos + 37°C, 180 minutos  
( $^{14}\text{C}$ =7375 CPM;  $^3\text{H}$ =160440 CPM) (19 Klett)
- F: 50°C, 30 minutos + 37°C, 240 minutos  
( $^{14}\text{C}$ =7733 CPM;  $^3\text{H}$ =173316 CPM) (33 Klett)

La flecha indica la posición normal de los nucleoides.

● ——— ●  $^{14}\text{C}$ -timidina. 0-----0  $^3\text{H}$ -leucina.



SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL



SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL

los gradientes. Después de 2 horas a 37°C (Figura 17-D), el perfil de sedimentación de los nucleoides retornó hacia la posición de los nucleoides no tratados termicamente, perdiendo al mismo tiempo la asociación con la proteína. La misma tendencia continua después de 3 y 4 horas a 37°C (Figuras 17-E y F). A las 4 horas a 37°C, una pequeña fracción de los nucleoides todavía sedimentada a 4500 S aproximadamente y en el fondo del gradiente se seguía observando un pico.

La cantidad de radioactividad ( $^{14}\text{C}$ -timidina cpm) que retorna a la posición de los nucleoides no-calentados fue el 60% del total después de 4 horas a 37°C. Este porcentaje está de acuerdo con el porcentaje de células capaces de reparar el daño térmico y crecer en placas (50%). Para poder comparar los resultados de los nucleoides con el crecimiento en placas (Figura 16) se midió en ambos casos la absorbancia a 660 nm antes de lisar las células. En la Figura 17 (nucleoides), el crecimiento después de reparar el daño térmico ocurrió a las 3 horas.

Los cocientes leucina/timidina (cpm) de las fracciones en los perfiles de sedimentación de la Figura 17 se observan en la Tabla 4. En la última región de sedimentación (fracciones 16-19) los cocientes son constantes dentro de cada perfil o en las mismas fracciones en diferentes perfiles (tiempos distintos de reparación a 37°C). En la región de los nucleoides sin calentar (fracciones 9-12) la tendencia es hacia una disminución en la cantidad de proteína asociada con los nucleoides a medida que la reparación progresa de 1 a 4 horas a 37°C. El pico en el fondo de los gradientes

(fracciones 24 y 25) mantuvo el mismo cociente proteína/DNA durante todo el proceso de reparación.

Las células calentadas (50°C, 30 minutos) y reparadas (37°C, 4 horas) se trataron para obtener esferoplastos con el mismo tratamiento empleado en el aislamiento de los nucleoides pero sin añadir la solución detergente C. Estos esferoplastos se centrifugaron en gradientes de sacarosa y aparecieron al fondo de los gradientes, como era de esperar, y con el mismo cociente leucina/timidina (cpm) que el pico en el fondo de los gradientes que hemos venido observando en todos los perfiles de la Figura 17 (Tabla 4).

El examen microscópico del material del fondo de los gradientes, procedente de células en periodo de reparación, reveló unos cuerpos redondeados de un tamaño 1/5 a 1/20 del tamaño original del E. coli K-12.

Cuando se aplica a las bacterias un tratamiento térmico mas prolongado (120 minutos a 50°C) y se sigue la reparación celular determinando su capacidad de formar colonias en Agar Luria y simultaneamente el perfil de sedimentación de sus nucleoides, se obtienen los resultados expresados en las Figuras 18 y 19. En la Figura 18, se dibujó una extrapolación indicando la tasa de crecimiento del microorganismo para así poder determinar el número de células injuriadas y muertas. El número de células que fueron capaces de recuperarse despues del tratamiento térmico (plateau antes del crecimiento y la división de novo) fué aproximadamente el 15% del número inicial. La Figura 19 muestra los perfiles de sedimentación de los nucleoides procedentes de la células de la Figura 18. Los perfiles

TABLA IV

COCIENTES LEUCINA/TIMIDINA (CPM) EN LOS NUCLEOIDES  
DE LAS CELULAS QUE ESTAN SUFRIENDO LA INJURIA TERMICA  
Y SU POSTERIOR REPARACION (FIGURA 17)

Fracción	COCIENTE $\frac{{}^3\text{H-leucina}}{{}^{14}\text{C-timidina}}$ (CPM)					Esfero- plastos
	50°C 30 min.	+ 1 hr. 37°C	+ 2 hr. 37°C	+ 3 hr. 37°C	+ 4 hr. 37°C	
9	9.7	6.0	9.2	5.0	4.0	72.3
10	9.1	7.0	4.8	2.7	2.6	79.8
11	8.8	9.9	3.5	2.5	2.5	87.0
12	8.1	5.6	3.6	3.3	3.2	104.0
16	7.5	7.6	6.7	7.7	8.0	47.0
17	7.7	8.2	7.7	8.1	7.0	30.2
18	8.0	8.2	8.4	8.1	6.7	20.0
19	10.0	7.9	8.6	7.9	7.7	15.9
24	15.5	13.3	12.1	13.7	13.6	10.7
25	12.8	14.0	13.9	11.7	12.6	14.8

FIGURA 18: INJURIA TERMICA Y SU REPARACION DESPUES DE UN TRATAMIENTO TERMICO A 50°C DURANTE 120 MIN.

Un cultivo celular en fase exponencial y marcado radiativamente con  $^{14}\text{C}$ -timidina y  $^3\text{H}$ -leucina sufrió un calentamiento a 50°C durante 120 minutos, fué recolectado, resuspendido en el mismo medio de cultivo sin radiactividad e incubado a 37°C. Durante la incubación se tomaron alicuotas periódicamente para observar los perfiles de sedimentación de los nucleoides de estas células (Figura 19) y para determinar el número de células viables en Agar Luria.

Las unidades Klett ( $\Delta$  ---  $\Delta$ ) representan la absorbancia a 660 nm medida en un colorímetro Klett-Summerson.

● ——— ● Recuentos en Agar Luria.

O ----- O Valores hipotéticos determinados conociendo el tiempo empleado por esta especie en duplicar el número de células.



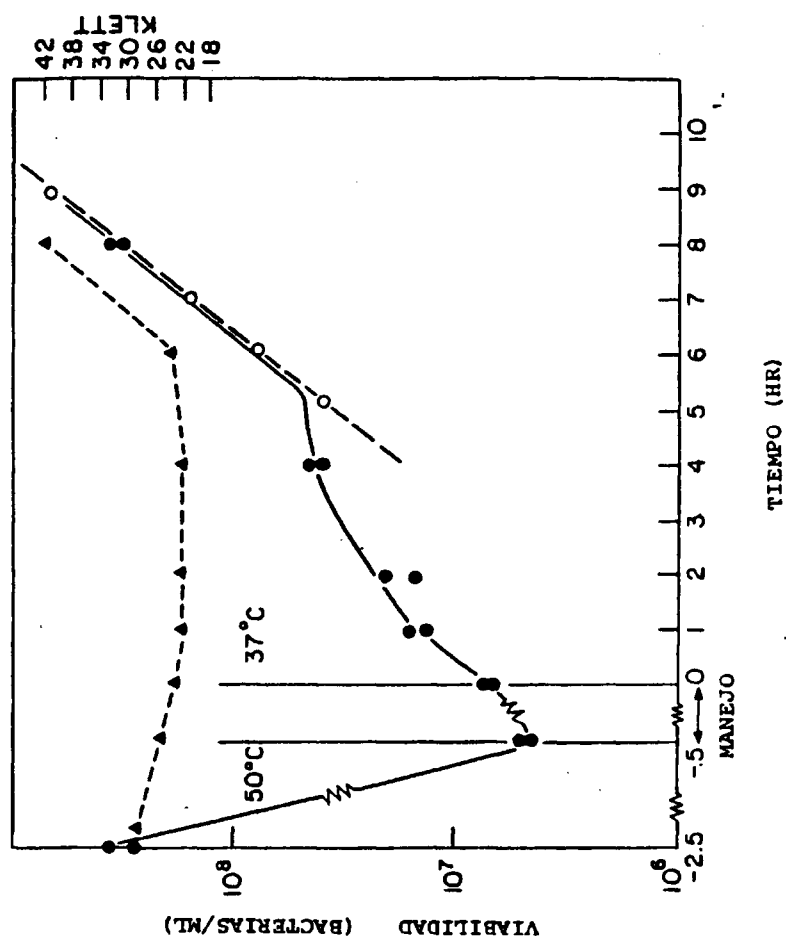


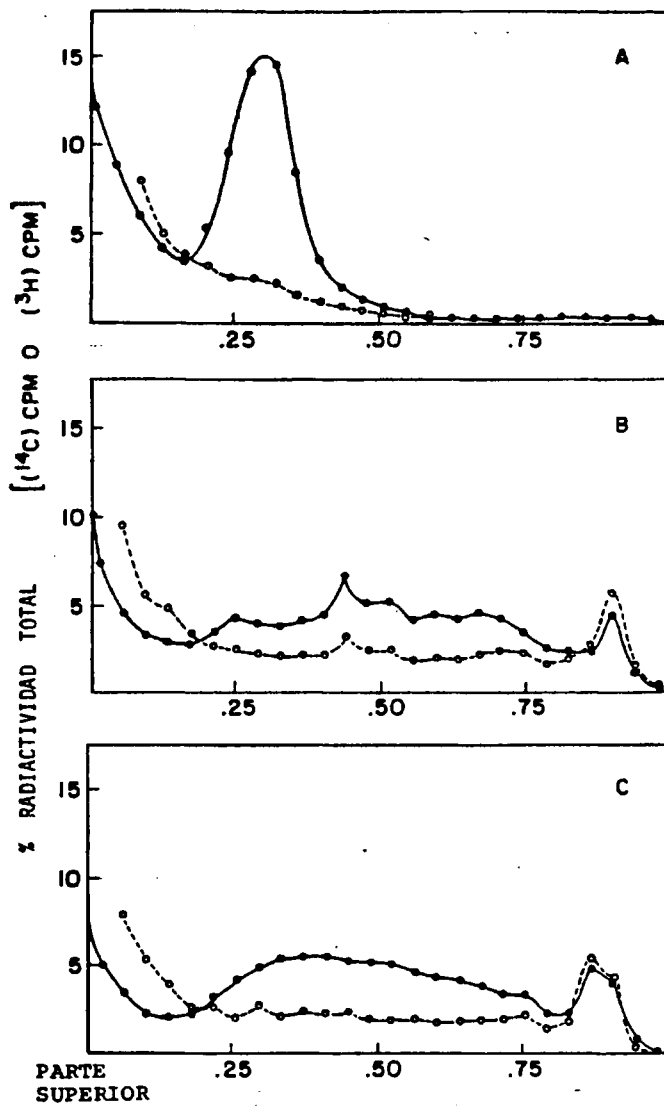
FIGURA 19: PERFILES DE SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES  
PROCEDENTES DE CELULAS SUFRIENDO INJURIA TERMICA  
(50°C, 120 MIN) Y SU REPARACION

En la Figura 18, simultaneamente a la determinación del número de células viables se llevó a cabo la lisis de estas células para así observar su perfil de sedimentación. La centrifugación de los lisados se llevó a cabo a 4000 rpm hasta un total ( $\omega^2 t$ ) de  $6 \times 10^9$  rad<sup>2</sup>/seg.

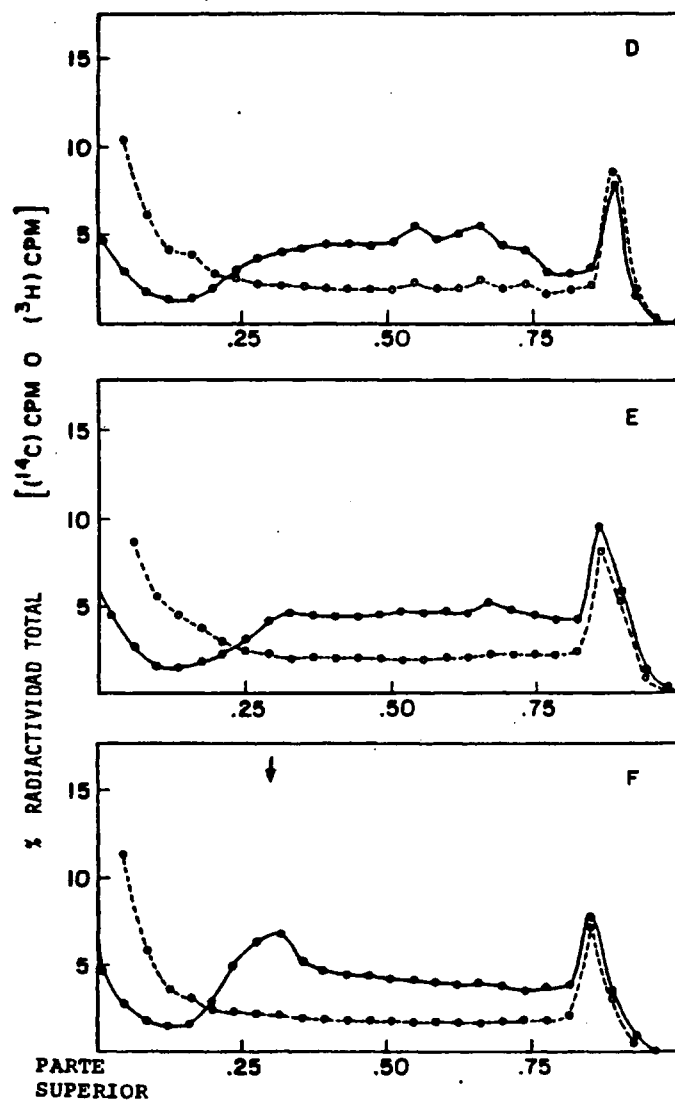
- A: Células no calentadas (<sup>14</sup>C=14982 CPM; <sup>3</sup>H=98449 CPM) (28 Klett)
- B: 50°C, 120 min (<sup>14</sup>C=11012 CPM; <sup>3</sup>H=79555 CPM) (25 Klett)
- C: 50°C, 120 min + 37°C, 1 hora.  
(<sup>14</sup>C=7726 CPM; <sup>3</sup>H=58171 CPM) (22 Klett)
- D: 50°C, 120 min + 37°C, 2 horas.  
(<sup>14</sup>C=7711 CPM; <sup>3</sup>H=58123 CPM) (22 Klett)
- E: 50°C, 120 min + 37°C, 4 horas.  
(<sup>14</sup>C=7300 CPM; <sup>3</sup>H=57829 CPM) (22 Klett)
- F: 50°C, 120 min + 37°C, 8 horas.  
(<sup>14</sup>C=7040 CPM; <sup>3</sup>H=56522 CPM) (42 Klett)

La flecha indica la posición normal de los nucleoides.

● ——— ● <sup>14</sup>C-timidina; O ——— O <sup>3</sup>H-leucina



SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL



son similares, aunque más planos y continuos, que los obtenidos de células reparando después de un tratamiento de 30 minutos (Figura 17). El pico en el fondo de los gradientes también es más pronunciado. Después de 5 horas a 37°C las células empiezan a crecer y en los perfiles de los nucleoides solo el 10% de la cantidad total de  $^{14}\text{C}$ -timidina retorna a la posición de los nucleoides sin tratamiento. Estas cifras indican que existe una buena correlación entre las células capaces de reparar y crecer en placas (15%) y las células capaces de reparar sus nucleoides (10%).

Para obtener más del 99% de células muertas, se empleó un tratamiento térmico de 52°C durante 40 minutos. Durante el período de reparación a 37°C se tomaron alícuotas para observar simultáneamente la capacidad celular de formar colonias (Figura 20) y los perfiles de sedimentación de sus nucleoides (Figura 21). Sometidos a este tratamiento térmico, los nucleoides exhibieron unos perfiles de sedimentación atípicos con agregaciones (picos muy agudos compuestos por una fracción solamente). Incluso después de que las células supervivientes hubieran empezado a crecer y dividirse de nuevo, los nucleoides no mostraron ninguna tendencia a retornar hacia la zona de los nucleoides normales (Figuras 21-C y D). El pico en el fondo de los perfiles es en este experimento mucho mayor que en el caso del tratamiento térmico durante 30 y 120 minutos a 50°C (Figuras 17 y 19) y aumenta durante el período de incubación de las células a 37°C (Figuras 21-A, B, C y D).

FIGURA 20: INJURIA TERMICA Y SU REPARACION DESPUES DE UN TRATAMIENTO TERMICO A 52°C DURANTE 40 MIN.

El procedimiento experimental fué el mismo descrito en la Figura 18, pero en este caso el tratamiento térmico se realizó a 52°C durante 40 minutos.

● ——— ● Recuentos en Agar Luria.

▲ ----- ▲ Absorbancia a 660 rpm.

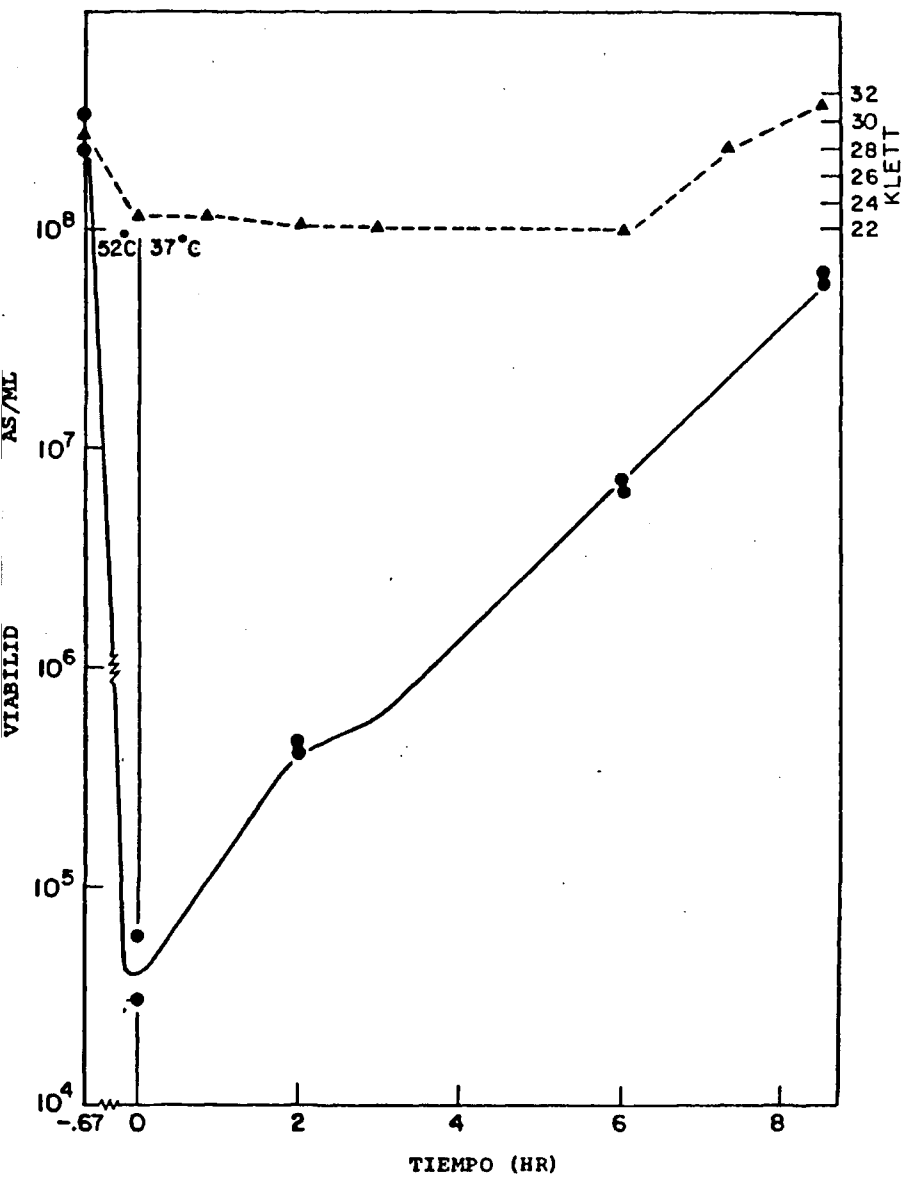


FIGURA 21: PERFILES DE SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES  
PROCEDENTES DE CELULAS SUFRIENDO INJURIA  
TERMICA (52°C, 40 MIN) Y SU REPARACION.

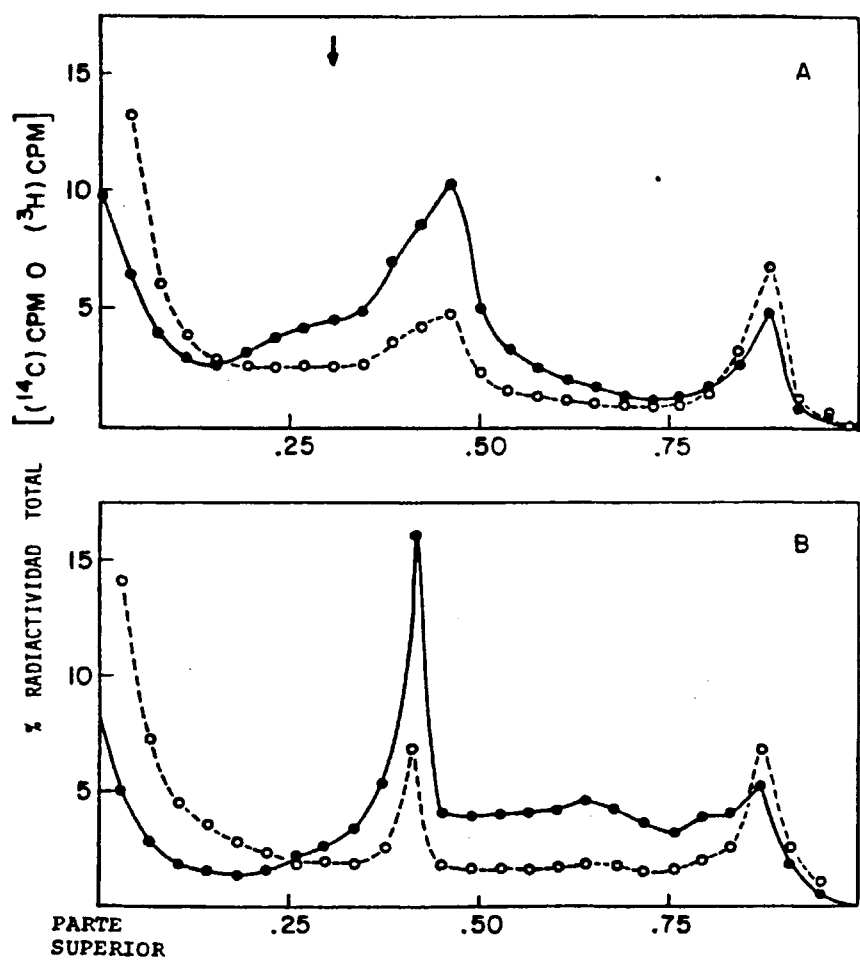
En la Figura 20, simultaneamente a la determinación del número de células viables, se llevó a cabo la lisis de estas células para así observar su perfil de sedimentación. La centrifugación de los lisados se llevó a cabo a 4000 rpm hasta un total ( $\omega^2 t$ ) de  $6 \times 10^6$  rad<sup>2</sup>/seg.

- A: 52°C, 40 min (<sup>14</sup>C=14351 CPM; <sup>3</sup>H=161785 CPM) (23 Klett)  
 B: 52°C, 40 min + 37°C, 2 horas.  
 (<sup>14</sup>C=12862 CPM; <sup>3</sup>H=154330 CPM) (22 Klett)  
 C: 52°C, 40 min + 37°C, 6 horas  
 (<sup>14</sup>C=11958 CPM; <sup>3</sup>H=148958 CPM) (22 Klett)  
 D: 52°C, 40 min + 37°C, 8.5 horas.  
 (<sup>14</sup>C=12869 CPM; <sup>3</sup>H=163283 CPM) (31 Klett)

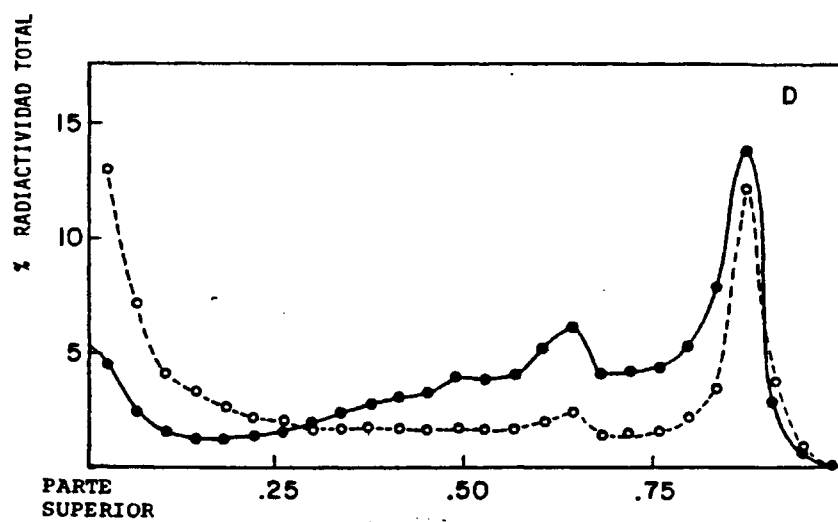
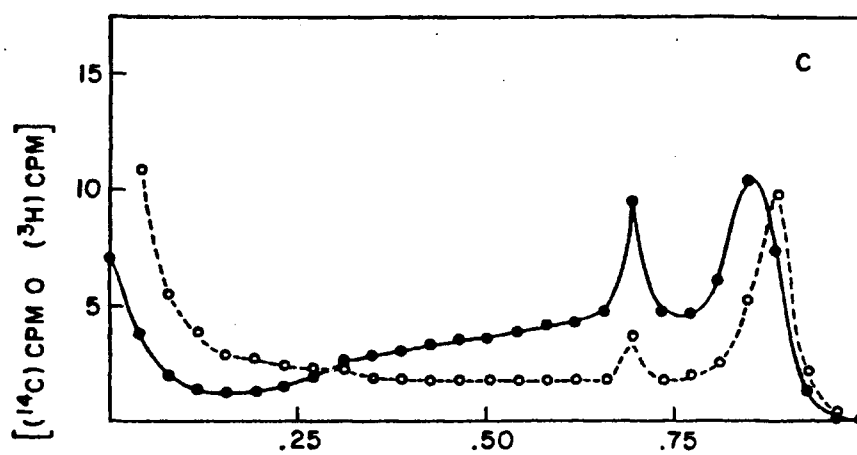
● ——— ● <sup>14</sup>C-timidina; O ——— O <sup>3</sup>H-leucina

La flecha indica la posición normal de los nucleoides.





SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL



SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL

## 2. Daño térmico y su reparación despues de períodos cortos de calentamiento.

Para determinar el período de recuperación despues de un tratamiento térmico durante tiempos cortos (3 - 5 minutos a 50°C) empleamos la medida de la absorbancia a 660 nm (Klett), ya que en el recuento en placas el error experimental es mayor que el efecto por el calor.

Despues de 5 minutos a 50°C el período de reparación celular a 37°C dura 40 minutos en el caso de cultivos no enfriados despues del tratamiento y 50 minutos cuando los cultivos fueron enfriados a 0°C (Figura 22).

Calentando las células a 50°C durante 4 minutos, enfriando el cultivo inmediatamente despues a 0°C y permitiendo entonces la reparación celular a medida que la temperatura aumentaba lentamente hasta 37°C, fué posible observar un proceso de reparación de los nucleoides que es sumamente rápido (Figura 23). Despues del calentamiento, los tubos de ensayo con 0.1 ml de la suspensión celular se enfriaron inmediatamente a 0°C y se transfirieron a una estufa a 37°C en una gradilla de plástico. En estas condiciones, los tubos llegaron a 25 - 30°C al cabo de 10 minutos. Durante el proceso (de 0 a 10 minutos) se volvieron a enfriar ciertos tubos a 0°C para lisar inmediatamente las células y poder observar el perfil de sedimentación de sus nucleoides. Despues del tratamiento térmico (50°C, 4 minutos), los nucleoides (Figura 23-A) aparecen principalmente en la parte superior del gradiente. Al comenzar el proceso de reparación aparece un pico intermedio de 1050 S aproximadamente y

FIGURA 22: INJURIA TERMICA Y SU REPARACION DESPUES DE UN TRATAMIENTO TERMICO DURANTE 5 MIN A 50°C.

Dos cultivos en fase exponencial se transfirieron de 37°C a 50°C durante 5 minutos. Uno de los cultivos se enfrió inmediatamente en un baño de agua y hielo a 0°C donde se mantuvo durante 1 minuto, y el otro se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Ambos se incubaron posteriormente a 37°C. Las unidades Klett representan la absorbancia a 660 nm.

● ——— ● 37°C → 50°C, 5 min → Temperatura ambiente,  
1 min → 37°C

○ ——— ○ 37°C → 50°C, 5 min → 0°C, 1 min → 37°C.

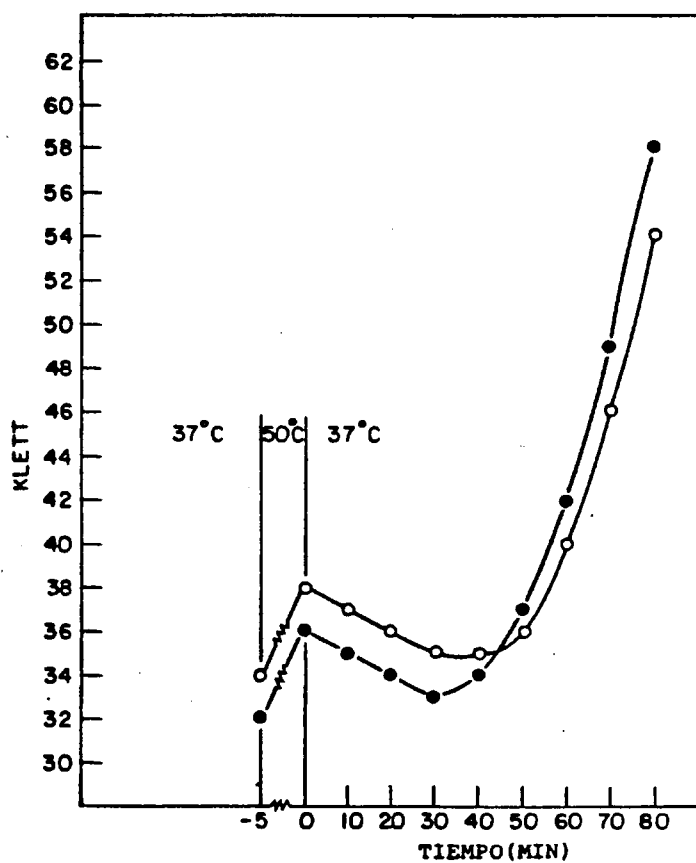


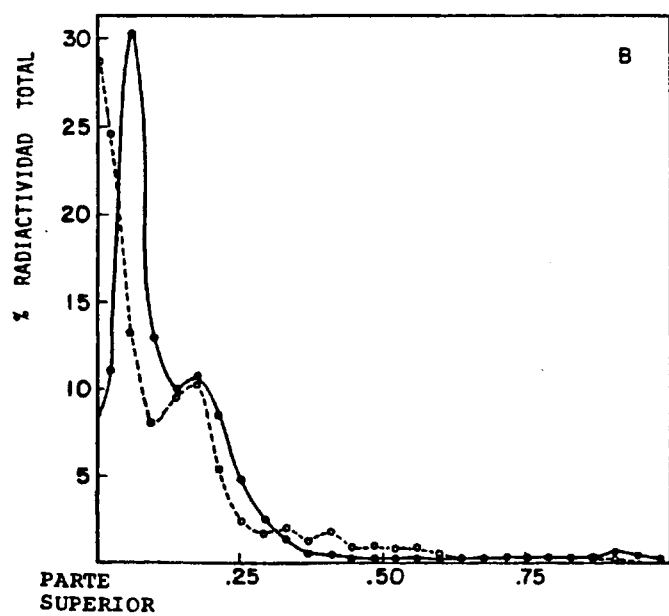
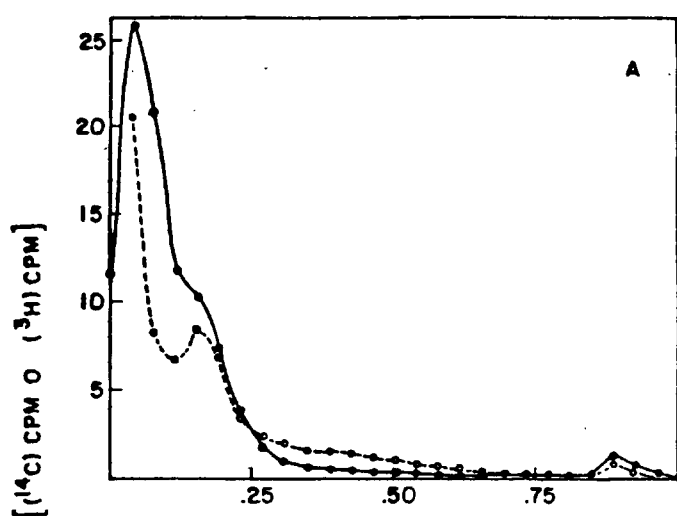
FIGURA 23: PERFILES DE SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES  
PROCEDENTES DE CELULAS SUPRIENDO INJURIA  
TERMICA (50°C, 4 MIN) Y SU REPARACION.

Un cultivo celular en fase exponencial y marcado radiactivamente con  $^{14}\text{C}$ -timidina y  $^3\text{H}$ -leucina se recolectó mediante centrifugación a 4°C y el sedimento fué resuspendido en el mismo medio de cultivo sin radioactividad a 0°C. Alicuotas de 0.1 ml se transfirieron a tubos de vidrio (12x75 mm) (0°C) en donde se calentaron a 50°C durante 4 minutos. Despues del tratamiento térmico los tubos se enfriaron en un baño a 0°C (1 min) y posteriormente se incubaron en una cámara a 37°C. En estas condiciones, solamente despues de 10 minutos lograron los tubos con las células calentadas alcanzar una temperatura de 25 a 30°C. Despues de los correspondientes tiempos de incubación las células se lisaron directamente sin recolección previa. Los lisados centrifugaron a 4000 rpm hasta un total ( $\omega^2t$ ) de  $6 \times 10^9 \text{ rad}^2/\text{seg}$ .

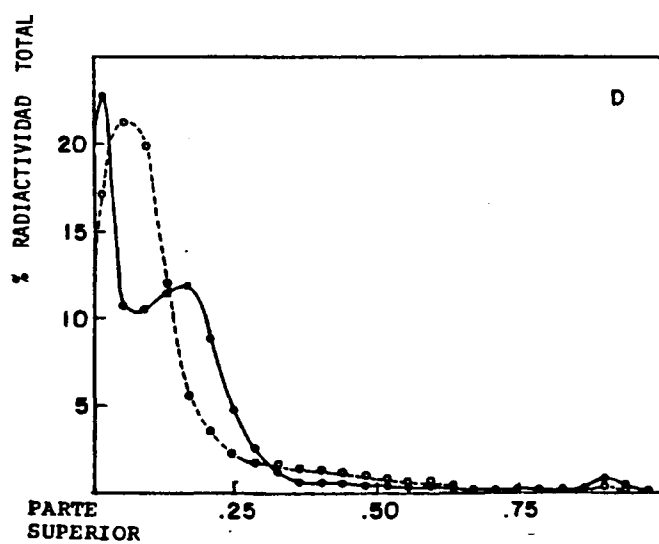
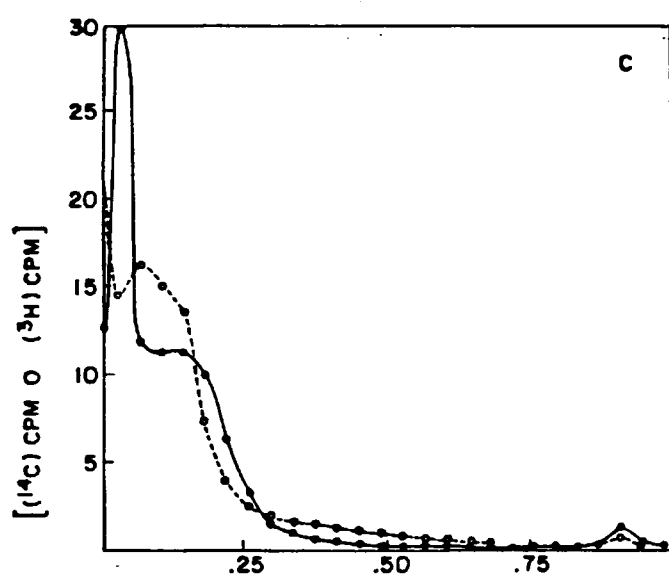
- A: 50°C, 4 min + 0°C, 5-10 min.  
( $^{14}\text{C}$ =28094 CPM;  $^3\text{H}$ =262912 CPM)  
B: 50°C, 4 min + 0°C, 1 min + 30 seg, cámara a 37°C  
( $^{14}\text{C}$ =28556 CPM;  $^3\text{H}$ =270350 CPM)  
C: 50°C, 4 min + 0°C, 1 min + 1 min, cámara a 37°C  
( $^{14}\text{C}$ =29035 CPM;  $^3\text{H}$ =272914 CPM)  
D: 50°C, 4 min + 0°C, 1 min + 2 min, cámara a 37°C  
( $^{14}\text{C}$ =24686 CPM;  $^3\text{H}$ =238148 CPM)  
E: 50°C, 4 min + 0°C, 1 min + 4 min, cámara a 37°C  
( $^{14}\text{C}$ =24479 CPM;  $^3\text{H}$ =241688 CPM)  
F: 50°C, 4 min + 0°C, 1 min + 10 min, cámara a 37°C  
( $^{14}\text{C}$ =22916 CPM;  $^3\text{H}$ =230811 CPM)

La flecha indica la posición normal de los nucleoides.

● ——— ●  $^{14}\text{C}$ -timidina; ○ ——— ○  $^3\text{H}$ -leucina.

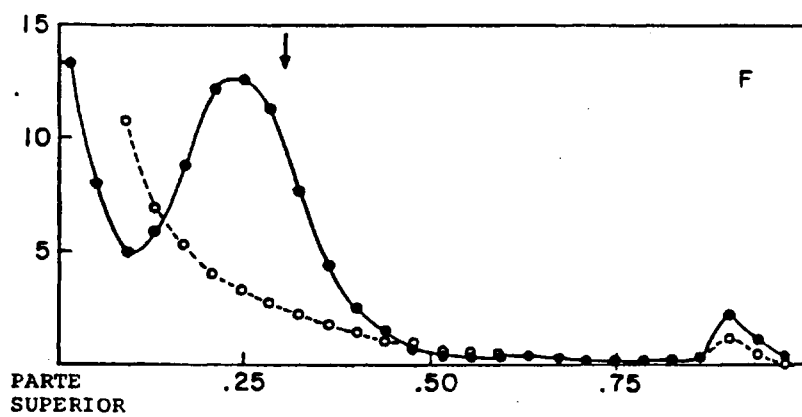
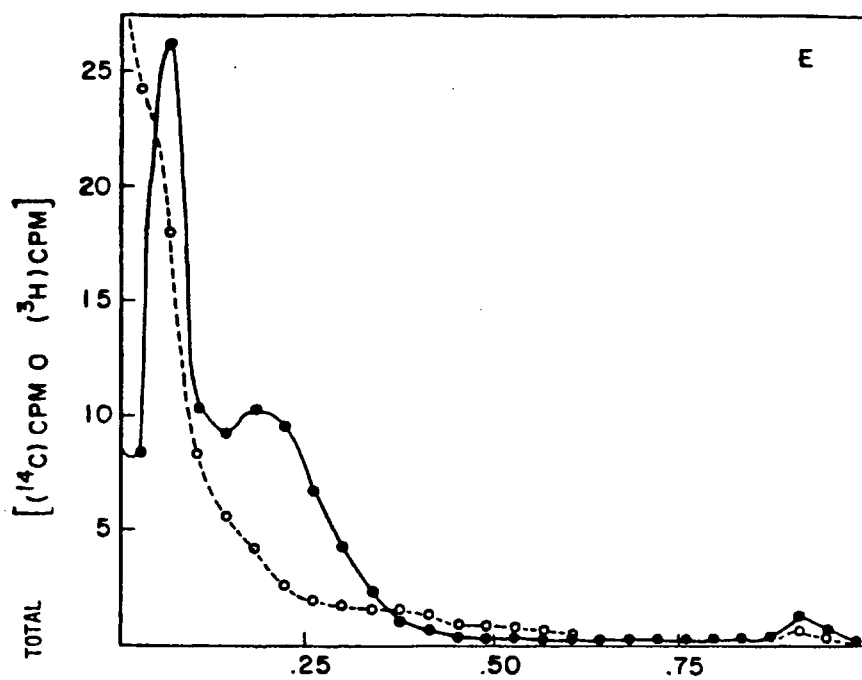


SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL



SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL





SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL

que parece estar inicialmente asociado con proteína para luego perder esta asociación (Figuras 23-B y C). Este pico intermedio y el DNA en la parte superior de los gradientes van cambiando progresivamente de coeficiente de sedimentación hasta formar un pico ancho con un coeficiente de sedimentación de 1500 S aproximadamente (Figuras 23-D a 23-F) cuando la temperatura ha subido hasta unos 30°C (10 minutos a 37°C).

El experimento se repitió calentando las células durante 3 minutos a 50°C (Figura 24-A) y sin posterior enfriamiento a 0°C siguiendo el proceso de reparación a 37°C. Después del tratamiento térmico se observó el movimiento de los nucleoides hacia la parte superior de los gradientes (Figura 24-A). Al cabo de 7 minutos a 37°C aparece en los gradientes un pico a 1600 S (Figura 24-B) y si el proceso de reparación se deja continuar durante 60 minutos el perfil de sedimentación de los nucleoides aparece más agudo y el coeficiente de sedimentación pasa entonces a ser el mismo de los nucleoides normales (Figura 24-C). En el perfil de los nucleoides después del tratamiento térmico (50°C, 3 minutos) se observa proteína asociada con un hombro intermedio de radioactividad (24-A).

Cuando el tiempo de calentamiento a 50°C se aumenta de 3 a 5 minutos y sin enfriamiento a 0°C se sigue el proceso de reparación a 37°C, los perfiles de sedimentación son similares a los observado en la Figura 24 (50°C, 3 minutos). Al cabo de 5 minutos a 37°C (Figura 25-B) el DNA pasa de estar en la parte superior del gradiente (Figura 25-A) a un pico ancho de 1600 S; si la reparación a 37°C continua hasta 60 minutos, el pico vuelve a aparecer en la

FIGURA 24: PERFILES DE SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES  
PROCEDENTES DE CELULAS SUFRIENDO INJURIA  
TERMICA (50°C, 3 MIN) Y SU REPARACION.

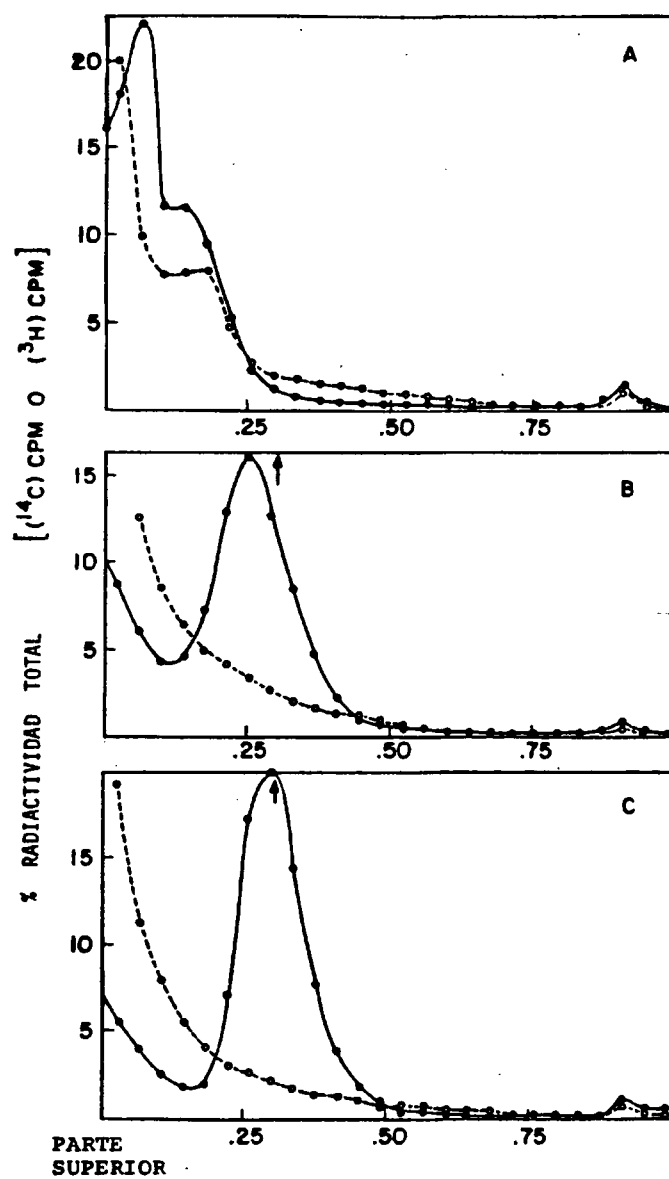
Un cultivo en fase exponencial marcado radioactivamente con  $^{14}\text{C}$ -timidina y  $^3\text{H}$ -leucina se calentó a 50°C durante 3 minutos siguiendo el mismo procedimiento experimental descrito en la Figura 23. Después del tratamiento térmico, uno de los tubos se enfrió inmediatamente en baño a 0°C y los otros dos se incubaron a 37°C sin enfriamiento previo. Las células se lisaron sin recolección previa y el lisado se centrifugó a 4000 rpm hasta un total ( $\omega^2 t$ ) de  $6 \times 10^9$   $\text{rad}^2/\text{seg}$ .

A: 50°C, 3 min + 0°C, 3 min ( $^{14}\text{C}$ =25842 CPM;  $^3\text{H}$ =194289 CPM)  
B: 50°C, 3 min + 37°C, 7 min ( $^{14}\text{C}$ =26039 CPM;  $^3\text{H}$ =212620 CPM)  
C: 50°C, 3 min + 37°C, 60 min ( $^{14}\text{C}$ =24277 CPM;  $^3\text{H}$ =204211 CPM)

La flecha indica la posición normal de los nucleoides.

● ——— ●  $^{14}\text{C}$ -timidina; ○ ——— ○  $^3\text{H}$ -leucina.





SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL

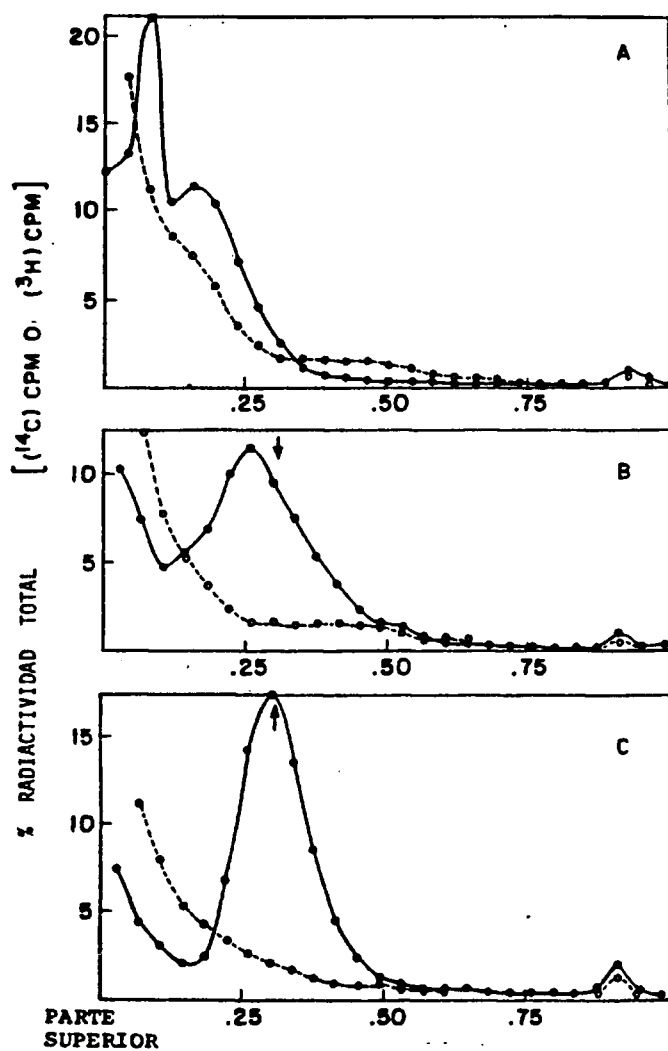
FIGURA 25: PERFILES DE SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES  
 PROCEDENTES DE CELULAS SUFRIENDO INJURIA  
 TERMICA (50°C, 5 MIN) Y SU REPARACION

El procedimiento experimental fué exactamente el mismo  
 descrito en la Figura 24 con la excepción del tiempo de  
 calentamiento.

A: 50°C, 5 min + 0°C, 3 min ( $^{14}\text{C}$ =23381 CPM;  $^3\text{H}$ =176723 CPM)  
 B: 50°C, 5 min + 37°C, 5 min ( $^{14}\text{C}$ =23950 CPM;  $^3\text{H}$ =192934 CPM)  
 C: 50°C, 5 min + 37°C, 60 min ( $^{14}\text{C}$ =22411 CPM;  $^3\text{H}$ =186423 CPM)

La flecha indica la posición normal de los nucleoides.

● ——— ●  $^{14}\text{C}$ -timidina; O ---- O  $^3\text{H}$ -leucina.



posición de los nucleoides normales y además se agudiza (Figura 25-C).

El papel que la síntesis de RNA juega en el proceso de reparación despues del tratamiento térmico se estudió mediante el uso del inhibidor rifampicina.

La adición de rifampicina a la suspensión celular a 0°C despues del tratamiento térmico ocasiona la inhibición parcial del proceso de reparación de los nucleoides (Figura 26). Cuando las células se calientan a 50°C durante 4 minutos con enfriamiento posterior a 0°C (durante 10 minutos) antes de lísarlas, todo su DNA aparece en la parte superior del gradiente (Figura 26-A). El mantenimiento de las células a 0°C durante 10 minutos dá lugar a un perfil de sedimentación distinto del obtenido cuando las células calentadas se mantienen a 0°C durante períodos de tiempo menores (Figura 23-A), esto indica que a 0°C ocurren ciertos cambios estructurales in vivo.

En células sin calentar, la adición de rifampicina a 0°C y la subsiguiente incubación a 37°C dán lugar a una disminución progresiva del coeficiente de sedimentación de sus nucleoides hasta 1300 S despues de 5 minutos (Figura 26-B) y hasta 1000 S despues de 60 minutos (Figura 26-D). Si añadimos la rifampicina a 0°C a células calentadas (50°C, 4 minutos) el proceso de reparación normal ocurre más lentamente y no acaba de completarse (Figuras 26-C y E); despues de 5 minutos a 37°C el pico en el perfil de sedimentación aparece a 600 S y despues de 60 minutos a 1000 S, que sigue siendo un valor mucho más pequeño que el de los nucleoides normales. La reparación del daño térmico en presencia de rifampicina, medida como incremento

FIGURA 26: PERFILES DE SEDIMENTACION DE LOS NUCLEOIDES  
PROCEDENTES DE CELULAS NORMALES Y SUFRIENDO  
INJURIA TERMICA (50°C, 4 MIN) Y SU REPARACION  
CON Y SIN RIFAMPICINA.

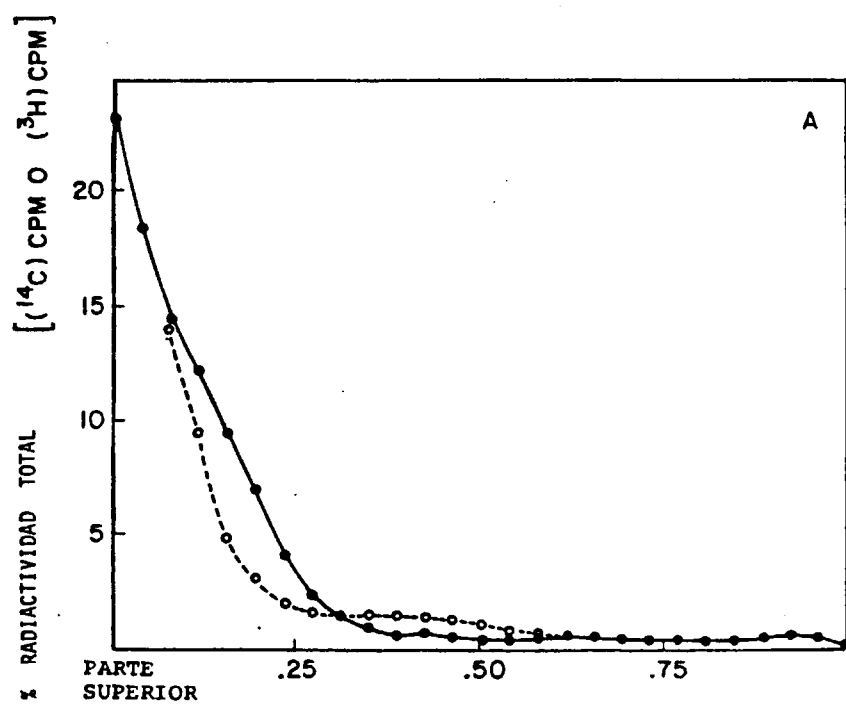
Un cultivo exponencial marcado con  $^{14}\text{C}$ -timidina y  $^3\text{H}$ -leucina se recolectó mediante centrifugación y el sedimento fué re-suspendido en el mismo medio de cultivo sin radiactividad a 0°C. Alicuotas de 0.1 ml se transfirieron a 5 tubos de vidrio (12x75 mm) (0°C). Tres de los tubos se calentaron a 50°C durante 4 minutos con posterior enfriamiento a 0°C, y las células en uno de ellos se lisaron para observar la sedimentación de los nucleoides despues del tratamiento térmico; a los otros dos tubos calentados se les añadió rifampicina (calbiochem, grado B) (100 µg/ml) a 0°C y posteriormente fueron incubados en un baño de agua a 37°C durante 5 y 60 minutos respectivamente. Como control, los dos tubos con la suspensión celular y sin calentar se mantuvieron a 0°C hasta la adicción de rifampicina y posteriormente se incubaron también en un baño de agua a 37°C durante 5 y 60 minutos respectivamente. Las células en todos los casos se lisaron sin recolección previa y los lisados se centrifugaron a 4000 rpm hasta un total ( $\omega^2 t$ ) de  $6 \times 10^9 \text{ rad}^2/\text{seg}$ .

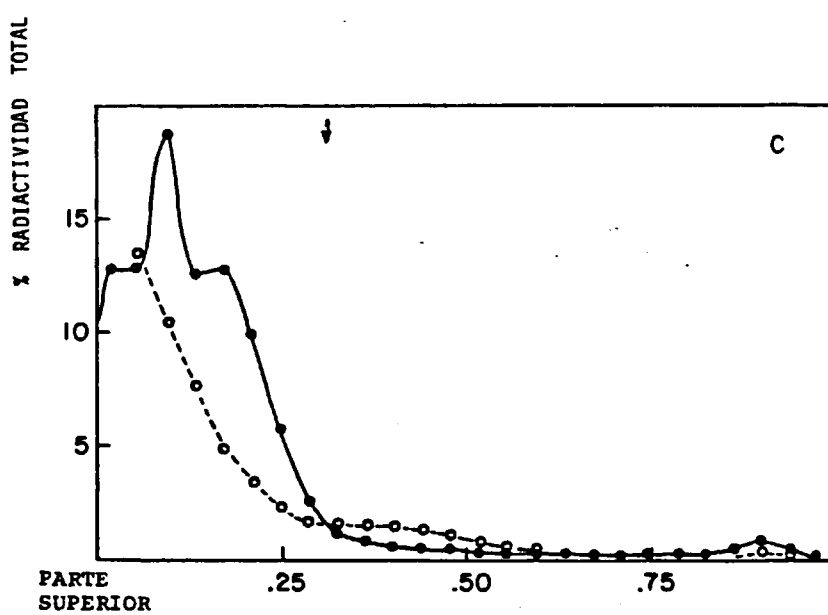
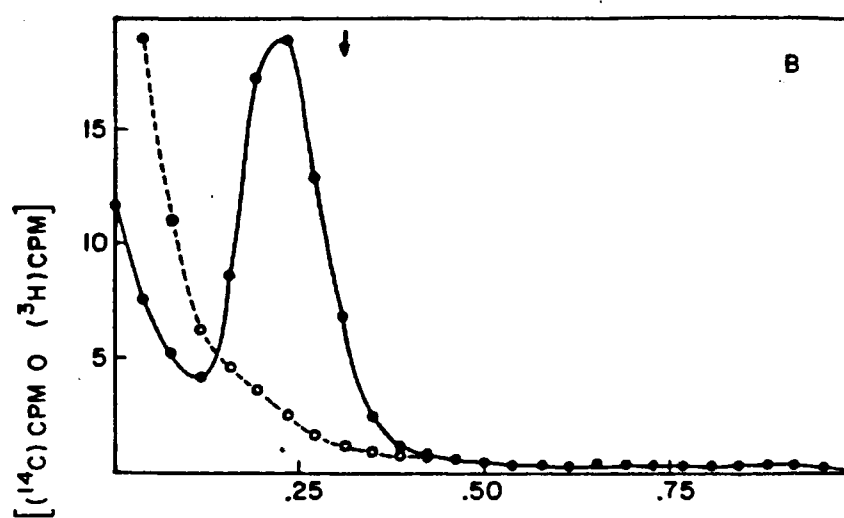
- A: 50°C, 4 min → 0°C, 10 min ( $^{14}\text{C}$ =16059 CPM;  $^3\text{H}$ =149752 CPM)  
 B: 0°C, 4 min  $\xrightarrow{\text{RIF}}$  37°C, 5 min ( $^{14}\text{C}$ =18261 CPM;  $^3\text{H}$ =185737 CPM)  
 C: 50°C, 4 min  $\xrightarrow{\text{RIF}}$  37°C, 5 min ( $^{14}\text{C}$ =15977 CPM;  $^3\text{H}$ =152597 CPM)  
 D: 0°C, 4 min  $\xrightarrow{\text{RIF}}$  37°C, 60 min ( $^{14}\text{C}$ =15047 CPM;  $^3\text{H}$ =149705 CPM)  
 E: 50°C, 4 min  $\xrightarrow{\text{RIF}}$  37°C, 60 min ( $^{14}\text{C}$ =15829 CPM;  $^3\text{H}$ =157462 CPM)

Las flechas indican la posición normal de los nucleoides.

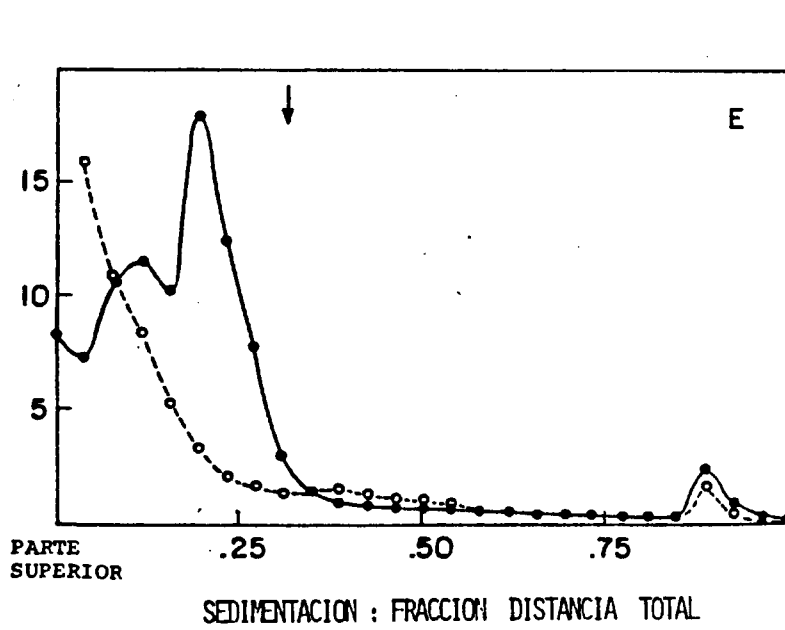
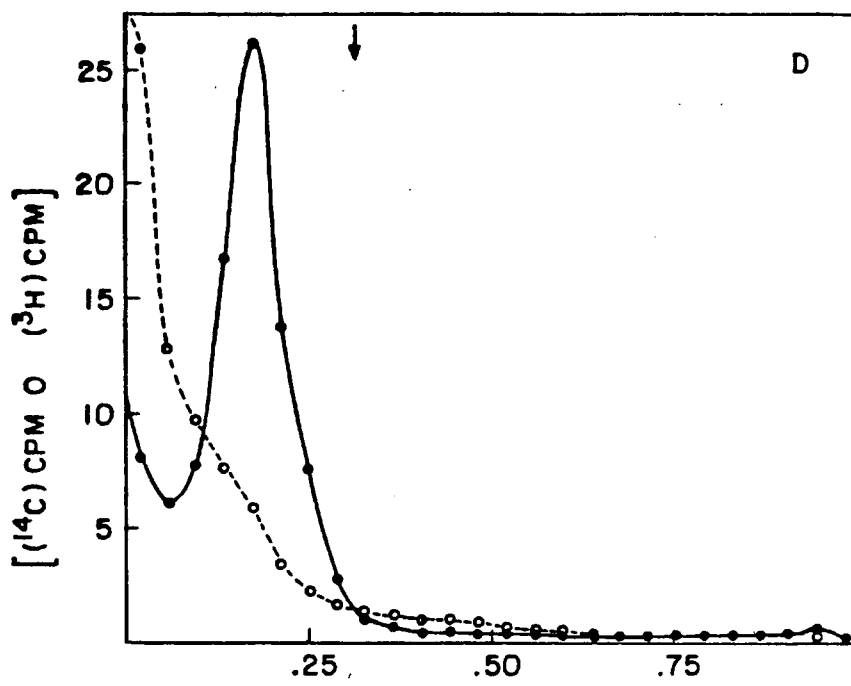
● ——— ●  $^{14}\text{C}$ -timidina; O ——— O  $^3\text{H}$ -leucina.







SEDIMENTACION : FRACCION DISTANCIA TOTAL



del coeficiente de sedimentación de los nucleoides, es inhibida parcialmente.

## V. DISCUSION

### A. Daño térmico

El tratamiento térmico de las bacterias, sin posterior enfriamiento, produce un aumento en el coeficiente de sedimentación de sus nucleoides desde 1800 S hasta 5000 S (Figura 4) acompañado de una mayor cantidad de proteína celular asociada a los mismos.

El calentamiento a 50°C durante períodos de tiempo cortos (6 a 8 minutos) origina un aumento progresivo en la cantidad de proteína asociada con los nucleoides a medida que el coeficiente de sedimentación aumenta dentro de cada perfil; sin embargo, después de 10 minutos de calentamiento el perfil de sedimentación de los nucleoides es un continuo desde 0 S hasta 5000 S (4000 rpm) y los coeficientes leucina/timidina (cpm) son similares en fracciones con muy distintos coeficientes de sedimentación (Figura 4-F). Esta observación no se puede explicar solamente en base al incremento de masa producido por la asociación de proteína sino que un nuevo proceso que afecta el nucleóide debe ser responsable de que, incluso teniendo la misma cantidad de proteína asociada a ellos, los nucleoides muestren coeficientes de sedimentación distintos.

Los tiempos de calentamiento cortos (2 a 4 minutos) con enfriamiento de las células a 0°C antes y después del tratamiento, dan lugar a nucleoides que tienen coeficientes de sedimentación menores de lo normal (1200 S) (Figura 5). Al aumentar el tiempo de calentamiento en estas condiciones, se observa un aumento del coeficiente de sedimentación (desde la posición 1200 S) que es similar al observado en células que no han sido enfriadas después del calentamiento

(Figura 4) pero en este caso (Figura 5) los nucleoides no llegan a alcanzar un valor tan alto en S y además tienen más tendencia a agregarse. Estas agregaciones están formadas por un pico que es muy agudo (una sola fracción) y en caso de ocurrir son capaces de agregar también a nucleoides completamente normales cuando ambas clases de nucleoides se lisan al mismo tiempo. La agregación en la Figura 5-C sugiere que los nucleoides procedentes de células calentadas y enfriadas posteriormente tienen más cabos de DNA sueltos que pueden entrecruzarse que los nucleoides calentados sin posterior enfriamiento.

El calentamiento durante períodos de tiempo mayores (15, 30 y 60 minutos) (Figura 6) no hace cambiar sustancialmente el perfil de sedimentación de los nucleoides con respecto al calentamiento durante 10 minutos (Figura 4-F), sí la centrifugación de los gradientes se lleva a cabo a 4000 rpm. El pico en el fondo del perfil aumenta progresivamente con el tiempo de calentamiento y parece estar compuesto de cuerpos redondeados y pequeños (posiblemente vesículas) de un tamaño de 1/5 a 1/20 del tamaño del microorganismo. Drlica et al. (1978) y Meyer et al. (1976) demostraron que más del 80% de los fragmentos de la membrana celular en los nucleoides asociados con membrana existen en forma de vesícula.

Centrifugando los nucleoides de células calentadas (15, 30 y 60 minutos) a 7000 rpm se observaron marcadas diferencias en los perfiles a medida que el tiempo de calentamiento aumentaba (Figura 7), indicándonos que la dependencia del coeficiente de sedimentación en la velocidad de centrifugación aumenta con el tiempo de

calentamiento, lo que a su vez sugiere que los nucleoides sufren un desdoblamiento progresivo de su DNA en estas condiciones (Hecht et al., 1977). Este desdoblamiento puede ser debido a una desestabilización del RNA en la parte central del nucleoide ya que Pettijohn et al. (1973) y Hecht y Pettijohn (1976) han demostrado la liberación del RNA asociado al nucleoide, después del calentamiento in vitro. Comprobaron en sus experimentos, que para que se iniciase la disociación se necesitaban temperaturas superiores a los 50°C (5 minutos) y para liberar todo el RNA, 96°C durante 5 minutos.

Los dos efectos principales producidos por el tratamiento térmico in vivo en los nucleoides, asociación de proteína y desdoblamiento, pueden explicar porqué los cocientes leucina/timidina son prácticamente similares en nucleoides con coeficientes de sedimentación muy distintos después de un calentamiento durante 10 ó más minutos (Figura 4-F). Aquellos nucleoides que han sufrido mayor daño térmico probablemente habrán sufrido también un mayor desdoblamiento y tendrán más cantidad de proteína asociada; la superposición de estos dos fenómenos de efecto contrario en el coeficiente de sedimentación de los nucleoides daría lugar a una población de nucleoides con el mismo cociente proteína/DNA y con coeficientes de sedimentación muy diferentes, como de hecho ocurre. El cociente proteína/DNA demuestra que después de 6 y 8 minutos de calentamiento (Figuras 4-D y E) predomina el efecto de la asociación de proteína, dando lugar a un aumento de la cantidad de proteína a medida que los coeficientes de sedimentación aumentan dentro de cada perfil. Después de 10 minutos de calentamiento, el desdoblamiento de los nu-

cleoides va aumentando en importancia relativa y compensa en dirección contraria el efecto de la mayor cantidad de proteína asociada con los nucleoides más dañados. La comparación de las pendientes de los cocientes leucina/timidina de las Figuras 4-D, E y F indica que el desdoblamiento aumenta durante unos 6 a 8 minutos de calentamiento pero pasa a ser relativamente importante después de 10 minutos (pendiente 0). Las pendientes también indican que al asociación de proteína precede al desdoblamiento de los dominios de DNA en el nucleóide.

Las Figuras 11 y 12 corroboran que después de 8 minutos de calentamiento existe un desdoblamiento de los dominios de DNA; en esas figuras se observan picos bien diferenciados, en vez de perfiles de sedimentación continuos, que corresponden a nucleoides que se centrifugan a 3700 rpm y 3000 rpm. Además cuando los mismos nucleoides se centrifugaron a 6000 rpm (Figura 12-C) su coeficiente de sedimentación disminuyó considerablemente aunque no debido a una pérdida de proteína (masa) a esta nueva velocidad ya que el cociente proteína/DNA era el mismo de antes. Esta dependencia tan enorme del coeficiente de sedimentación en la velocidad de centrifugación solamente puede deberse a un grado considerablemente de desdoblamiento o desestabilización estructural (Hecht *et al.*, 1977).

Los nucleoides de células calentadas durante 120 minutos (Figura 8) presentaron un coeficiente de sedimentación medio de 3750 S aproximadamente y el perfil de sedimentación era más plano que el de los nucleoides de células calentadas durante menos tiempo. En



este caso, la disminución del coeficiente de sedimentación puede ser debido a una combinación de dos efectos: desdoblamiento del DNA en el nucleóide y rotura del DNA. La rotura del DNA queda patente en el aumento sustancial de la cantidad de DNA en la parte superior del gradiente. Los perfiles de sedimentación de estos nucleóides calentados durante tanto tiempo (120 minutos) muestran a veces múltiples agregaciones al ir perdiendo su estructura cuando el daño térmico es tan pronunciado. La inducción por el calor de roturas en el DNA de *E. coli* ha sido bien establecida en diversos trabajos (Woodcock y Grigg, 1972; Gómez, 1977; Sedgwick y Bridges, 1972; Pierson *et al.*, 1978) y también se sabe que la rotura del DNA produce una disminución del coeficiente de sedimentación de los nucleóides (Lydersen y Pettijohn, 1977; Pettijohn, 1976), pero no hace variar el efecto de la velocidad de centrifugación en este coeficiente. Es muy probable por lo tanto que los nucleóides de células calentadas durante 15, 30 y 60 minutos hayan sufrido roturas en su DNA aunque este efecto es difícil de separar completamente del desdoblamiento de los nucleóides.

Los nucleóides calentados asociados con proteína, se compararon con los nucleóides asociados con membrana producidos lisando las células sin calentar con una solución detergente sin sarkosyl. Si marcamos radioactivamente los fosfolípidos de la membrana celular con  $^3\text{H}$ -glicerol, se puede observar que los nucleóides asociados con membrana (12.8% del total de cpm  $^{14}\text{C}$ -timidina y 22.8% del total de cpm  $^3\text{H}$ -glicerol) sedimentan a 3750 S. Los porcentajes entre paréntesis nos indican que el  $13\%/70\% = 19\%$  (70% es el total de cpm

<sup>14</sup>C-timidina en ambos picos de la Figura 9-A) de los nucleoides está asociado, al menos, con el 22.8% de la cantidad total de membrana, lo que sugiere que estos nucleoides deben tener asociada a ellos la membrana completa de E. coli (aproximadamente el 20% del total de nucleoides tiene asociada el 20% de la cantidad total de membrana). Esta conclusión se apoya también en el hallazgo de Materman y Van Gool (1978) de que el nucleoide es capaz de atrapar fragmentos de las envolturas celulares en el momento en que estas están formando vesículas. Otra posible explicación de tal cantidad de membrana asociada al nucleoide podría ser la existencia de vesículas (membranas) sin DNA y con el mismo coeficiente de sedimentación, aunque esta alternativa iría en contra de los resultados obtenidos por Drlica et al. que determinaron que el nucleoide asociado a la membrana y la membrana tienen distintos, aunque adicionales, coeficientes de sedimentación. Bajo sus condiciones experimentales el nucleoide asociado con membrana sedimentaba a 5800 S y al separarlo de la membrana 1700 S, siendo el coeficiente de sedimentación de esta membrana 4000 S.

El perfil de los nucleoides procedentes de células calentadas y lisadas con sarkosyl no mostró ninguna cantidad apreciable de fosfolípidos (membrana) asociada a ellos indicando que en nuestras condiciones de trabajo el nucleoide calentado y asociado con proteína no está asociado a la membrana. Si las células calentadas se lisan con la técnica empleada en la obtención de nucleoides asociados con membrana (Figuras 9-A y 9-C) se puede observar un aumento del coeficiente de sedimentación de los nucleoides y la cantidad de

<sup>3</sup>H-glicerol en este nuevo pico es 22.6% (la misma que se obtiene con células sin tratar); este aumento del coeficiente de sedimentación y el hecho de que el pico pasa a ser más agudo sugiere que la estructura del nucleóide queda estabilizada por el esqueleto que la membrana le proporciona o simplemente que la adición de nuevas proteínas procedentes de la membrana incrementan la masa del nucleóide.

La relación entre el desdoblamiento del nucleóide que el calor induce y los procesos que le ocurren intracelularmente al nucleóide en estas condiciones es difícil de establecer ya que siempre cabe la posibilidad de que el desdoblamiento sea un efecto indirecto producido por la técnica empleada en lisar las células, siendo el efecto primario la pérdida de la característica superhelicoidal del DNA en el nucleóide producida por la rotura del DNA que el calor induce. Como Richardson (1975) indicó, cuando se trata el complejo DNA-RNA naciente con dodecil sulfato sódico, todo el RNA se libera si el DNA no es superhelicoidal, mientras que cuando el DNA es superhelicoidal, solo se libera el 40% del RNA; el otro 60% queda sin embargo más enlazado al DNA aparentemente por medio de una hélice híbrida de unos 600 nucleótidos de longitud. Si este mismo fuera el efecto del sarkosyl en los nucleóides, la pérdida de superhelicidad del DNA, inducida por el calor, podría ocasionar un desdoblamiento del nucleóide, después del tratamiento con sarkosyl, debido a la liberación de RNA a partir del DNA no-superhelicoidal. El nucleóide desplegado sería entonces una estructura artificial que se forma durante la lisis. Otros autores han sugerido también

esta última posibilidad (Materman y Van Gool, 1978).

El procedimiento de lisis se modificó de diferentes maneras con el fin de disociar la proteína que se había asociado con los nucleoides durante el calentamiento:

- a. Aumentando la cantidad de lisozima (10 mg/ml y 40 mg/ml).
- b. Aumentando el tiempo de incubación con lisozima (15 y 30 minutos a 25°C).
- c. Aumentando la concentración de sarkosyl en la solución detergente (50 mg/ml y 100 mg/ml).
- d. Aumentando la temperatura y tiempo de incubación de la solución detergente (25°C, 15 y 30 minutos).
- e. Combinando los factores a, b, c y d.

Con ninguna de estas variaciones del método de obtención de los nucleoides se pudo detectar variación alguna de los nucleoides asociados con membrana lo que sugiere que la asociación nucleoide-proteína se establece dentro de la célula. Esta conclusión se basa también en los experimentos de reconstrucción (Figura 14) en los cuales se lisaron conjuntamente células calentadas y sin calentar sin que dieran lugar a ninguna interacción visible entre ambos nucleoides.

El efecto relativo de la velocidad de centrifugación en los coeficientes de sedimentación de los nucleoides sin calentar y asociados con membrana, en los nucleoides calentados asociados con proteína y en los nucleoides calentados asociados con membrana y proteína se determinó a velocidades de centrifugación distintas (6000, 4000, 3700 y 3000 rpm) (Figuras 9, 11 y 12). Los

nucleoides sin calentar, tanto libres de membrana como asociados a la misma, no mostraron ningún cambio en su coeficiente de sedimentación. Los nucleoides calentados y asociados con proteína se vio que eran muy dependientes de la velocidad de centrifugación por encima de 3700 rpm y pasaron de sedimentar a 5500 S (3700 rpm) a sedimentar a 1700 S aproximadamente (6000 rpm); el nuevo pico sigue estando asociado con proteína lo que indica que el cambio no se debe a ninguna pérdida importante de masa. La dependencia del coeficiente de sedimentación de estos nucleoides calentados queda reflejada también en la Figura 13 a velocidades de 4000, 7000, 17000 y 30000 rpm. De estos experimentos se deduce que de 4000 rpm hasta menos de 6000 rpm el coeficiente de sedimentación de los nucleoides calentados depende enormemente de la velocidad de centrifugación, mientras que a más de 6000 rpm los nucleoides empiezan a formar agregaciones, siendo estas agregaciones inespecíficas ya que incluyen nucleoides sin calentar lisados conjuntamente.

La velocidad de centrifugación a la que los nucleoides calentados se empiezan a agregar, es difícil de determinar debido a su enorme dependencia de la velocidad por encima de 4000 rpm. A 4000 rpm, el perfil de sedimentación continuo (plano) se debe fundamentalmente al desdoblamiento de la estructura y no a agregación como se demostró lisando células calentadas y sin calentar simultáneamente; en estas condiciones, solamente 2.5% de los nucleoides sin calentar aparecieron asociados a los nucleoides calentados. A 3700 rpm, no se observó prácticamente ninguna agregación (Figura 14). En la Tabla 5 se puede observar la comparación de la dependencia del coeficiente de sedimentación en la velocidad de centrifuga-

TABLA V

DEPENDENCIA DEL COEFICIENTE DE SEDIMENTACION EN LA VELOCIDAD DE CENTRIFUGACION (NUCLEOIDES CALENTADOS Y SIN CALENTAR)

Velocidad de Centrifugación (CPM)	Nucleoide Normal	Nucleoide Asociado a la Membrana <sup>a</sup>	Despues de 30 min a 50°C b
3000	1800S	5300S	~ 5500S
4000	1800S	5200S	~ 4500S
7000	1800S	5000S	~ 1300S
17000	1600S	3500S	~ 1000S
30000	1000S		~ 800S

a. Hecht et al. (1977)

b. Determinados en este trabajo.

ción en nucleoides calentados y no calentados.

La comparación de los nucleoides calentados y asociados con membrana y proteína (Figura 11-C) con los nucleoides sin calentar y asociados con membrana (Figura 11-A) nos indica que hay una mayor cantidad de proteína asociada a los nucleoides calentados, lo que sugiere que el tratamiento térmico da lugar a la asociación con proteína que no es, o al menos no solamente es, proteína de membrana. De hecho, el 4% del total de las cpm de  $^3\text{H}$ -leucina asociado al nucleoide asociado con membrana y no calentado (Figura 11-A) explica el aumento, (de 23% a 27%) de la cantidad de  $^3\text{H}$ -leucina que el nucleoide calentado sufre, cuando se deja intacta su asociación con la membrana (Figuras 11-B y C) e indica que, al menos, parte de la diferencia entre el coeficiente de sedimentación de los nucleoides calentados con y sin membrana se debe a la adición de la proteína de membrana. El último razonamiento concuerda con el hecho comprobado de que la misma cantidad total de fosfolípidos de membrana se asocia a los nucleoides sin calentar asociados con membrana y a los nucleoides calentados asociados con membrana y con proteína (Figuras 9-A y 9-C).

#### B. Reparación después del daño térmico

Tratando a las células de E. coli K-12, cepa KU 105, a  $50^\circ\text{C}$  durante 120 minutos la pérdida de viabilidad fue de 2.7 ciclos logarítmicos (Figura 15) y durante la reparación a  $37^\circ\text{C}$  los recuentos se volvieron a incrementar desde  $4 \times 10^5$  a  $2.5 \times 10^6$  células/ml; este aumento en células viables se debía a las células capaces de

reparar el daño térmico y no a crecimiento y división celular ya que el medio de cultivo no poseía ninguno de los 5 aminoácidos que esta cepa requiere. En las células incubadas en medio definido con los aminoácidos requeridos se observó primero el mismo aumento en viabilidad que en el caso anterior y después un plateau en el número de células viables que es típico del final del período de reparación (Busta, 1978) y que precede al crecimiento y división celular (la absorbancia óptica a 660 nm empieza a aumentar de nuevo con el nuevo crecimiento celular). Al mismo tiempo que las células en medio completo vuelven a crecer, las que están incubadas en medio sin aminoácidos mueren o pierden su viabilidad en las placas, lo que sugiere que el bloqueo de la síntesis proteica puede ser letal para nuestra cepa de E. coli.

El tratamiento térmico de las células durante 30 minutos a 50°C (Figura 16) produce aproximadamente un 50% de células que, sufriendo el daño térmico, luego son capaces de repararlo (plateau en el recuento de células viables); después de 4 horas a 37°C estas células empiezan a crecer de nuevo y a dividirse, como lo indica el aumento de densidad óptica. La reparación se muestra en los perfiles de sedimentación de los nucleoides (Figura 17) como una restauración del pico propio de los nucleoides sin calentar, a partir del perfil continuo y plano que corresponde a los nucleoides asociados con proteína que se observa inmediatamente después del tratamiento térmico. Después de 1 hora a 37°C (Figura 17-C) ocurre una cierta reparación del desdoblamiento del nucleóide como se puede deducir de la pérdida de material en el centro del gradiente que



pasa a ser menos dependiente de la velocidad de centrifugación; estos nucleoides, así como los que aparecían inicialmente a 4750 S (Figura 17-B) sedimentan ahora a aproximadamente 5500 S (Figura 17-C). La última deducción está de acuerdo con el hecho de que los nucleoides calentados durante 30 minutos a 50°C tienen un coeficiente de sedimentación de 5500 S cuando se centrifugan a 3000 rpm (Figura 12-A) y con los experimentos de Iandolo (1974) que determinó que la síntesis de RNA, (y no la proteína) se iniciaba inmediatamente después del tratamiento térmico. El aumento del coeficiente de sedimentación, después de 1 hora de reparación, puede indicar al mismo tiempo reparación de las roturas del DNA que se sabe que ocurre en estas condiciones (Woodscook y Grigg, 1972; Gómez, 1977) y que daría lugar también a un aumento del coeficiente de sedimentación (Ulmer, 1978). Después de 2 horas a 37°C (Figura 17-C), la proteína se va dissociando de los nucleoides al ir estos regresando progresivamente hacia la posición de los nucleoides sin calentar; este movimiento va acompañado, como se esperaba, por una disminución del cociente leucina/timidina (proteína/DNA) en aquellas fracciones que corresponden a la región de los nucleoides sin calentar (Tabla 4). Después de 3 horas a 37°C (Figura 17-E), cuando la densidad óptica empieza a aumentar, lo que indica un crecimiento de novo, podemos observar un pico que ya no tiene proteína asociada en la posición de los nucleoides normales. El proceso de reparación queda completado después de 4 horas a 37°C (Figura 17-E); en ese momento, el 60% de la  $^{14}\text{C}$ -timidina ha regresado a la posición de los nucleoides normales (Figura 17-A). Este nuevo pico está compuesto

de nucleoides completamente reparados y está de acuerdo con la observación de que aproximadamente el 50% de las células son capaces de reparar el daño térmico en estas condiciones de calentamiento, como lo demuestran los recuentos de células viables en placas. Estos resultados, tomados conjuntamente sugieren que para que la célula sea capaz de crecer y dividirse previamente debe tener lugar la reparación del desdoblamiento del nucleóide y de su asociación con la proteína celular.

Teniendo en cuenta que las proteínas de membrana solamente representan del 10 al 20% de la proteína celular (Stanier *et al.* 1976) hemos de deducir (Tabla 6) que la proteína citoplásmica (o al menos no solo la proteína de membrana) debe estar asociada al nucleóide después del tratamiento térmico. La cantidad de proteína asociada aumenta a medida que lo hace el tiempo de calentamiento a 50°C.

La curva de reparación en placas de las células calentadas durante 120 minutos (Figura 18) muestra un incremento inicial en el número de células viables que es típico de la reparación y que indica que aproximadamente el 15% de las células calentadas son capaces de recuperarse y más tarde (5 horas a 37°C) volver a crecer y dividirse. El perfil de sedimentación de los nucleoides a los mismos tiempos de los recuentos en placas indica que después de una, dos y cuatro horas a 37°C no hubo ninguna variación significativa; sin embargo, después de 8 horas, cuando la reparación se ha completado y el crecimiento *de novo* ha vuelto a ocurrir, podemos observar un pico pequeño en la posición de los nucleoides normales y que no tiene

TABLA VI

PORCENTAJE DE  $^3\text{H}$ -LEUCINA QUE SE RECUPERAN  
EN LAS FRACCIONES 10-27 DE LOS GRADIENTES<sup>a</sup>.

Tratamiento Térmico	% $^3\text{H}$ -Leucina (CPM)
No calentados	9.9
50°C, 15 min	24.8
50°C, 30 min	26.8
50°C, 60 min	32.5
50°C, 120 min	38.2

- a. La fracción 10 representa la posición en el gradiente en la cual el porcentaje de proteína celular total, proveniente de la parte superior, deja de ser significativa. La fracción 27 es la última fracción (parte inferior del gradiente).

proteína asociada. Este pico contiene aproximadamente el 10% del total de  $^{14}\text{C}$ -timidina, indicando que aproximadamente este porcentaje de células son capaces de reparar sus nucleoides, porcentaje que por otra parte concuerda con el de supervivencia de las células en placas que es aproximadamente del 15%.

El calentamiento de las células a  $52^{\circ}\text{C}$  durante 40 minutos (Figura 20) nos permite investigar las características de los nucleoides de las células incapaces de repararse y que por lo tanto mueren puesto que estas condiciones de calentamiento dan lugar a la muerte de más del 99% de las bacterias. Los perfiles de sedimentación de los nucleoides (Figura 21) no muestran ninguna reparación en el tiempo de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  lo que sugiere que las células son incapaces de reparar sus nucleoides. Estos nucleoides de células muertas mostraron dos características: a) formación de agregaciones a 4000 rpm, sugiriendo daño estructural pronunciado, y b) formación de un pico en el fondo del gradiente que mediante examen microscópico demostró estar formado por cuerpos redondeados, posiblemente vesículas, con DNA y proteínas asociadas o atrapadas en ellos.

Si las células de E. coli K-12 cepa KU 105 que empleamos en este estudio se tratan térmicamente a  $50^{\circ}\text{C}$ , durante períodos de tiempo cortos (por ejemplo 5 minutos), se produce una disminución en el número de células viables de menos del 20% (Figura 3) y la inducción de un período de 35 - 45 minutos antes de un nuevo crecimiento y división celular (Figura 22). Estos tratamientos cortos (3 a 5 minutos) producen una disminución del coeficiente de sedimentación de los nucleoides hasta 1200 S aproximadamente (Figura 5), aunque el

valor exacto depende del tiempo que las células se mantiene a 0°C después del tratamiento térmico (Figuras 5, 23, 24, 25 y 26). La reparación de estos nucleoides se siguió durante la incubación a 37°C. Cuando las células calentadas se mantuvieron a 0°C durante 3 minutos después del tratamiento térmico (50°C, 4 min; Figura 23-A), la mayor parte del DNA aparece en la parte superior de los gradientes con un hombro en el perfil de sedimentación a unos 1000 S; durante la reparación de 0°C a 37°C (Figura 23) los nucleoides aumentaron progresivamente su coeficiente de sedimentación de 1000 S a 1500 - 1600 S que coincide con el coeficiente de sedimentación de nucleoides procedentes de células que no sufrieron enfriamiento a 0°C después del tratamiento térmico. Este experimento indica que el nucleóide repara el daño térmico progresivamente y en un período de tiempo muy corto a temperatura ambiente; este proceso de reparación va acompañado de pérdida de la proteína (aproximadamente 5%) asociada con el hombro a 1200 S (Figuras 23-A, B, C y D). El cambio del coeficiente de sedimentación (de 1800 S a 1200 S) puede deberse a uno o más cambios estructurales que nuestra técnica no puede discernir en estas condiciones;

- a. Efecto del enfriamiento a 0°C inmediatamente después del calentamiento impidiendo el "reanillamiento" (reannealing) de las cadenas del DNA.
- b. Roturas del DNA.
- c. Desdoblamiento del nucleóide debido a la disociación del DNA.
- d. Cambios estructurales debidos a la proteína asociada.

- e. Combinaciones de los efectos anteriores (por ejemplo, el "desapareado" (unpairing) de las bases ó la rotura del DNA daría lugar a la pérdida de las superhélices de DNA lo que a su vez produciría la liberación del RNA de los nucleoides durante la lisis de las células bajo tratamiento detergente).

De cualquier manera existe una asociación real de proteína (aproximadamente 5% del total) que puede ser el paso inicial del proceso de asociación de proteína que da lugar a nucleoides con coeficiente de sedimentación mucho mayores de lo normal (5500 S) que se observan después de un tratamiento térmico prolongado (Figura 12). La proteína asociada con los nucleoides calentados durante tiempos cortos se disocia después de una incubación de las células a 37°C durante menos de 5 minutos (Figuras 24-B y 25-B), esta reparación tan rápida puede explicar porqué los nucleoides de las células que no se enfriaron a 0°C, después de un breve tratamiento térmico ya no tienen un coeficiente de sedimentación tan bajo.

Si a las células tratadas por el calor durante tiempos cortos se les permite reparar el daño térmico a 37°C durante 60 minutos, los nucleoides muestran un cambio en su coeficiente de sedimentación, desde 1600 S (5 minutos de reparación a 37°C) hasta 1800 S, que es el coeficiente de sedimentación de los nucleoides sin calentar (Figuras 24-C y 25-C); además, el pico de los nucleoides aparece más agudo y por lo tanto más parecido a los nucleoides normales. El tiempo de reparación completa también coincide en este caso con el comienzo de la división celular después del período de reposo producido por el

tratamiento térmico (Figura 22).

En la Tabla 7 se observa la relación entre el porcentaje de células capaces de recuperarse (en placas) del daño producido por distintos tratamientos térmicos y el porcentaje de nucleoides que regresan a la posición normal de los nucleoides sin calentar (y que liberaron la proteína asociada por el tratamiento). Como indica esta tabla, el porcentaje de nucleoides capaces de regresar es muy semejante al número de células capaces de reparar el daño térmico y de sobrevivir, lo que sugiere que la reparación de la estructura del nucleóide es, por lo menos, uno de los procesos que se requieren para que la célula sea capaz de reiniciar el crecimiento y la división.

La adición de rifampicina a células sin calentar produjo un cambio en el coeficiente de sedimentación de los nucleoides, de 1800 S a aproximadamente 1300 S después de 5 minutos de incubación a 37°C y a 1000 S después de 60 minutos (Figuras 26-B y D). La rifampicina es un inhibidor de la síntesis de RNA y actúa en la RNA polimerasa que es dependiente del DNA; su acción se ejerce uniéndose a la enzima libre e inhibiendo la iniciación de la transcripción, pero no la terminación de la síntesis de RNA que hubiera empezado antes de la adición de rifampicina. Los resultados sugieren que es necesaria la síntesis de novo de RNA para mantener la estructura del nucleóide, incluso en células que no están creciendo (esto es suponiendo que la única acción de la rifampicina en la célula sea la inhibición de la iniciación de la transcripción). Dworsky (1975) ya demostró que el coeficiente de sedimentación de los nucleoides

TABLA VII

EFFECTO DE LA REPARACION CELULAR EN LA VIABILIDAD  
Y EN LA INTEGRIDAD DE LOS NUCLEOIDES.

Tratamiento Térmico	% Recuperación de Viabilidad	% Nucleoides Reparados
<u>50°C, 5 min</u>	90-100	>95
<u>50°C, 30 min</u>	50	60
<u>50°C, 120 min</u>	15	10
<u>52°C, 40 min</u>	<1	0



asociados con membrana disminuía cuando las células se trataban con rifampicina durante su crecimiento e incorporación de material radioactivo.

Cuando se adicionaba rifampicina a las células durante la reparación del daño térmico (4 minutos, 50°C), el proceso de reparación nunca se llegó a completar (Figuras 26-C y E). Después de 5 minutos a 37°C el coeficiente de sedimentación de los nucleoides era de aproximadamente 600 S y después de 60 minutos era de unos 1100 S, lo que indica la necesidad de una síntesis de novo de RNA para que sea posible la reparación completa de la estructura del nucleóide como era de esperar de los resultados previos con los nucleoides sin calentar; sin embargo, parece que parte del proceso de reparación ocurre incluso en presencia de rifampicina. Además, cuando la reparación se hizo en presencia de rifampicina no se observó proteína asociada con el nucleóide, lo que sugiere que la asociación de proteína ocurre a través de la síntesis de novo de RNA o está relacionada con la integridad del nucleóide que a su vez depende de la síntesis de RNA, que es bloqueada por la rifampicina.

## VI CONCLUSIONES

1. Cuando las células de E. coli en crecimiento exponencial se tratan térmicamente durante menos de 5 minutos a 50°C y a continuación se enfrían inmediatamente a 0°C, el coeficiente de sedimentación de sus nucleoides disminuye. Esta disminución no se observa cuando se omite el enfriamiento a 0°C.
2. Si las células se tratan térmicamente a 50°C durante más de 6 minutos, con o sin posterior enfriamiento, los nucleoides aparecen primeramente asociados con proteína y después con su DNA desdoblado. Estos cambios estructurales se detectaron determinando la dependencia de los coeficientes de sedimentación de la velocidad de centrifugación.
3. La proteína asociada con los nucleoides aumentó su coeficiente de sedimentación.
4. La cantidad de proteína asociada con los nucleoides aumentó con la duración del tratamiento térmico.
5. La proteína asociada con el nucleóide no pudo ser liberada cambiando: a) la concentración de lisozima o el tiempo de incubación; b) la concentración de sarkosyl o el tiempo de incubación; c) la temperatura de lisis.
6. Aumentando la duración del tratamiento térmico a 50°C aumenta la tendencia de los nucleoides a agregarse. Cuando la centrifugación de los nucleoides calentados a 50°C durante 30 minutos se llevaba a cabo a más de 4000 rpm, también tenía lugar la agregación.

7. A velocidades de centrifugación menores de 4000 rpm, los nucleoides calentados aparecen como una población homogénea y no se puede detectar desdoblamiento diferencial entre ellos.
8. El coeficiente de sedimentación de los nucleoides calentados asociados simultaneamente con membrana y proteína es menos dependiente de la velocidad de centrifugación que el de los nucleoides calentados asociados con proteína a 4000 rpm, pero forman tambien agregaciones por encima de 4000 rpm.
9. Los nucleoides sin calentar asociados con membrana parecen estar asociados a la membrana celular completa.
10. Los nucleoides calentados asociados con proteína no contienen fosfolípidos de membrana.
11. La proteína asociada con los nucleoides tratados térmicamente no es, o al menos no lo es exclusivamente, proteína de membrana.
12. Cuando se lisan conjuntamente células tratadas y sin tratar térmicamente, los nucleoides calentados no interaccionan con los nucleoides sin calentar.
13. El bloqueo de la síntesis de proteína parece ser letal para nuestra cepa de E. coli despues de la reparación del daño térmico.
14. La reparación de los nucleoides, despues del tratamiento térmico, queda reflejada en la restauración del coeficiente de sedimentación de los nucleoides sin calentar.
15. El porcentaje de nucleoides reparados es similar al porcentaje de células capaces de recobrar la capacidad de formar colonias en placas.

16. Durante el período de reparación, los nucleoides primero reparan el desdoblamiento del DNA y después liberan la proteína asociada a los mismos.

17. La reparación de los nucleoides después de un calentamiento durante menos de 5 minutos a 50°C coincide con la reiniciación del crecimiento celular.

18. La incubación de células sin calentar con rifampicina produce una disminución del coeficiente de sedimentación de sus nucleoides.

19. La reparación de los nucleoides de células tratadas térmicamente en la presencia de rifampicina es más lenta y no se llega a completar totalmente.

## VII BIBLIOGRAFIA

- Allwood, M.C., and A.D. Russell. 1970. Mechanisms of thermal injury in nonsporulating bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* 12:88-116.
- Baltz, R.H., P.M. Bingham, and J.W. Drake. 1976. Heat mutagenesis in bacteriophage T4: The transition pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:1269-1273.
- Barnard, E.A. 1967. *Ann. Rev. Biochem.* 38:677.
- Beuchat, L.R. 1978. Injury and repair of gram negative bacteria, with special consideration of the involvement of the cytoplasmic membrane. *Adv. Appl. Microbiol.* 23:219-243.
- Boedtker, H. 1968. Molecular weight and conformation of RNA. IN: *Methods in Enzymology*, 12-B. (S. Colowick and N. Kaplan, eds.) pp. 429-460. New York: Academic Press.
- Bridges, B.A., M.J. Ashwood-Smith, and R.J. Munson. 1969 a. Susceptibility of mild thermal and of ionizing radiation damage to the same recovery mechanisms in Escherichia coli. *Biochem. Biophysic. Res. Communications.* 35:193-196.
- Bridges, B.A., M.J. Ashwood-Smith, and R.J. Munson. 1969 b. Correlation of bacterial sensitivities to ionizing radiation and mild heating. *J. Gen. Microbiol.* 58:115-124.
- Burgi, E. and A.D. Hershey. 1963. Sedimentation rate as a measure of molecular weight of DNA. *Biophys. J.* 3:309-321.
- Busta, F.F. 1976. Practical implications of injured microorganisms in foods. *J. Milk Food Technol.* 39:138-145.
- Busta, F.F. 1978. Introduction to injury and repair of microbial cells. *Adv. Appl. Microbiol.* 23:195-201.
- Cairns, J. 1963. The Chromosome of Escherichia coli. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28:43-45.
- Chia, D. and V.N. Schumaker. 1974. A rotor speed dependent crossover in sedimentation velocities of DNA's of different sizes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56:241-246.
- Collins-Thompson, D.L., A. Hurst, and H. Kruse. 1973. Synthesis of enterotoxin B by Staphylococcus aureus strain S6 after recovery from heat injury. *Can. J. Microbiol.* 19:1463-1468.
- Cook, P.R. and I.A. Brazell. 1976. Detection and repair of single-strand breaks in nuclear DNA. *Nature.* 263:679-682.

- Crine, P. and W.G. Verly. 1976. Determination of single-strand breaks in DNA using neutral sucrose gradients. *Anal. Biochem.* 75:583-595.
- Crumplin, G.C. and J.T. Smith. 1976. Nalidixic acid and bacterial chromosome replication. *Nature.* 260:643-645.
- Cummings, D. 1964. Sedimentation and biological properties of T-even phages of Escherichia coli. *Virology.* 23:408-418.
- Cunningham, R.P. and H. Berger. 1977. Chromosome structure of Escherichia coli mutants temperature sensitive for deoxyribonucleic acid replication. *J. Bacteriol.* 131:499-504.
- Delius, H. and A. Worcel. 1974. Electron microscopic visualization of the folded chromosome of Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 82:107-109.
- Drlica, K., E. Burgi, and A. Worcel. 1978. Association of the folded chromosome with the cell envelope of Escherichia coli: Nature of the membrane-associated DNA. *J. Bacteriol.* 134:1108-1116.
- Drlica, K. and M. Snyder. 1978. Superhelical Escherichia coli DNA: Relaxation by coumermycin. *J. Mol. Biol.* 120:145-154.
- Drlica, K. and A. Worcel. 1975. Conformational transitions in the Escherichia coli chromosome: Analysis by viscometry and sedimentation. *J. Mol. Biol.* 98:393-411.
- Dworsky, P. 1975. Unfolding of the chromosome of Escherichia coli after treatment with rifampicin. *Z. Allg. Mikrobiol.* 15:243-247.
- Dworsky, P. and M. Schaechter. 1973. Effect of rifampicin on the structure and membrane attachment of the nucleoid of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 116:1364-1374.
- Eiguer, J., H. Boedtker, and G. Michaels. 1961. The thermal degradation of nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta.* 51:165-168.
- Emmerson, P.T. 1968. Recombination deficient mutants of Escherichia coli K-12 that map between thyA and argA. *Genetics.* 60:19-30.
- Flink, I. and D.E. Pettijohn. 1975. Polyamines stabilize DNA folds. *Nature.* 253:62-63.
- Ganesan, A.K. and K.C. Smith. 1971. The duration of recovery and DNA repair in excision deficient derivatives of Escherichia coli K-12 after ultraviolet irradiation. *Molec. Gen. Genetics.* 113:285-296.
- Gellert, M., M.H. O'Dea, T. Itoh, and J.I. Tomizawa. 1976. Nalidixic acid resistance: A second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:4772-4776.

- Giorno, R., R.M. Hecht and D.E. Pettijohn. 1975. Analysis by isopycnic centrifugation of isolated nucleoids of Escherichia coli. Nucleic Acids Res. 2:1559-1567.
- Goldmark, D.J. and S. Linn. 1970. An endonuclease activity from Escherichia coli absent from certain rec strains. Proc. Natl. Acad. Sci. 67: 434-441.
- Gomez, R.F. 1977. Nucleic acid damage in thermal inactivation of vegetative microorganisms. Adv. Biochem. Eng. 5:49-67.
- Gomez, R.F., K.D. Blais, A. Herrero and A.J. Sinskey. 1976. Effects of some inhibitors of protein, RNA and DNA synthesis on heat injured Salmonella typhimurium LT-2. J. Gen. Microbiol. 97:19-27.
- Gomez, R.F. and A.J. Sinskey. 1973. Deoxyribonucleic acid breaks in heated Salmonella typhimurium LT-2 after exposure to nutritionally complex media. J. Bacteriol. 115:522-528.
- Gomez, R.F., A.J. Sinskey, R. Davies and T.P. Labuza. 1973. Minimal medium recovery of heated Salmonella typhimurium LT-2. J. Gen. Microbiol. 74:267-274.
- Gray, R.J.H., L.D. Witter and Z.J. Ordal. 1973. Characterization of mild thermal stress in Pseudomonas fluorescens and its repair. Appl. Microbiol. 26:78-85.
- Grecz, N. and S. Bhatarakamol. 1977. Apurinic acid endonuclease implicated in DNA breakage in Escherichia coli subjected to mild heat. Biochem. Biophys. Res. Comm. 77:1183-1188.
- Greer, S. and S.J. Zamenhof. 1962. Studies on depurination on DNA by heat. J. Mol. Biol. 4:123-141.
- Hansen, E.W. 1971. Dan. Tidsskr. Farm. 45:339-344.
- Hecht, R.M. and D.E. Pettijohn. 1976. Studies of DNA bound RNA molecules isolated from nucleoids of Escherichia coli. Nucleic Acid Res. 3:767-788.
- Hecht, R.M., D. Stimpson and D.E. Pettijohn. 1977. Sedimentation properties of the bacterial chromosome as an isolated nucleoid and as an unfolded DNA fiber: Chromosomal DNA unfolding measured by rotor speed effects. J. Mol. Biol. 111:257-277.
- Hitchener, B.J. and A.F. Egan. 1977. Outer membrane damage in sublethally heated Escherichia coli K-12. Can. J. Microbiol. 23:311-318.
- Howard-Flanders, P., R.P. Boyce and L. Theriot. 1966. Three loci in Escherichia coli K-12 that control the excision of pyrimidine dimers and certain other mutagen products from DNA. Genetics. 53:1119-1136.

- Howard-Flanders, P. and L. Theriot. 1966. Mutants of Escherichia coli K-12 defective in DNA repair and in genetic recombination. Genetics. 53: 1137-1150.
- Hurst, A. 1977. Bacterial injury: a review. Can. J. Microbiol. 23:935-944.
- Hurst, A., A. Hughes, J.L. Beare-Rogers, and D.L. Collins-Thompson. 1973. Physiological studies on the recovery of salt tolerance by Staphylococcus aureus after sublethal heating. J. Bacteriol. 116:901-907.
- Hurst, A., A. Hughes, D.L. Collins-Thompson and B.G. Shah. 1974. Relationship between loss of magnesium and loss of salt tolerance after sublethal heating of Staphylococcus aureus. Can. J. Microbiol. 20: 1153-1158.
- Iandolo, J.J. 1974. Repair of stress-induced macromolecular alterations in Staphylococcus aureus. New York Acad. Sci. Annals. 236:160-17.
- Iandolo, J.J. and A.J. Ordal. 1966. Repair of thermal injury of Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 91:134-142.
- Kaplan, R. and D. Apirion. 1975. Decay of ribosomal ribonucleic acid in Escherichia coli cells starved for various nutrients. J. Biol. Chem. 250:3174-3178.
- Kavenoff, R. 1972. Characterization of the Bacillus subtilis W23 genome by sedimentation. J. Mol. Biol. 72:801-806.
- Kavenoff, R. and B.C. Bowen. 1976. Electron microscopy of membrane-free folded chromosomes from Escherichia coli. Chromosoma (Berlin) 59: 89-101.
- Kleinschmidt, A.K., D. Lang and R.K. Zahu. 1961. Über die intrazelluläre formation von bakterien-DNS. Z. Naturforsch. 16b:730-739.
- Kleppe, K. and I. Lossius. 1978. Influence of mutagens on the nucleoid structure of the chromosome in Escherichia coli. Abstracts Annual Meeting Amer. Soc. Microbiol. pp. 125 (abstract).
- Korch, C., S. Ovrebo and K. Kleppe. 1976. Envelope-associated folded chromosome from Escherichia coli: Variation under different physiological conditions. J. Bacteriol. 127:904-916.
- Kornberg, T., A. Lockwood and A. Worcel. 1974. Replication of the Escherichia coli chromosome with a soluble enzyme system. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71:3189-3193.
- Krakoff, I.H., N.C. Brown and P. Reichard. 1968. Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. Cancer Research. 28: 1559-1565.



- Lacombe, C. and B. Lubochinsky. 1977. Caracterisation de la membrane liee au chromosome replie isole de Escherichia coli. Biochimie. 59:877-884.
- Lederberg, J. 1957. Mechanism of action of penicillin. J. Bacteriol. 73:144.
- Lee, A.C. and J.M. Goepfert. 1975. Influence of selected solutes on thermally induced death and injury in Salmonella typhimurium. J. Milk Food Technol. 38:195-200.
- Levin, D. and F. Hutchinson. 1973. Neutral sucrose sedimentation of very large DNA from Bacillus subtilis. I. Effect of random-double-strand breaks and centrifuge speed on sedimentation. J. Mol. Biol. 75:455-478.
- Ljungquist, S. 1977. A new endonuclease from Escherichia coli acting on apurinic sites in DNA. J. Biol. Chem. 252:2806-2814.
- Loehr, J. and P. Hanawalt. 1977. On the termination of the DNA replication cycle in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 117:85-94.
- Lydersen, B.K. and D.E. Pettijohn. 1977. Interactions stabilizing DNA tertiary structure in the Escherichia coli chromosome investigated with ionizing radiation. Chromosoma (Berlin). 62:199-215.
- Marmouchi, T. and W. Messer. 1973. Replication of a specific terminal segment in Escherichia coli which is required for cell division. J. Mol. Biol. 78:221-228.
- Materman, E.C. and A.P. Van Gool. 1978 a. Nucleoid release from Escherichia coli cells. J. Bacteriol. 133:878-883.
- Materman, E.C. and A.P. Van Gool. 1978 b. Compact Escherichia coli nucleoids in a highly supercoiled conformation. J. Bacteriol. 135:703-706.
- McGrath, R.A. and R.W. Williams. 1966. Reconstruction in vivo of irradiated Escherichia coli deoxyribonucleic acid; the rejoining of broken pieces. Nature (London). 212:534-535.
- Meyer, M., M.A. De Jong, C.L. Woldringh and N. Nanninga. 1976 a. Factors affecting the release of folded chromosomes from Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 63:469-475.
- Meyer, M., M.A. De Jong, C.L. Woldringh, and N. Nanninga. 1976 b. Significance of folded chromosomes released from amino acid starved Escherichia coli cells. Eur. J. Biochem. 65:409-414.
- Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics, pp. 218-220. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.

- Natori, S., R. Nozawa and D. Mizuno. 1966. The turnover of ribosomal RNA of *Escherichia coli* in a magnesium-deficient stage. *Biochem. Biophys. Acta.* 114:245-253.
- Ohtaka, Y. and K. Uchida. 1963. The chemical structure and stability of yeasts ribosomes. *Biochem. Biophys. Acta.* 76:94-104.
- Osmerod, and Lehman. 1971. Artefacts arising from the sedimentation of high molecular weight DNA on sucrose gradients. *Biochem. Biophys. Acta.* 247:369-372.
- Pellon, J.R. and R.F. Gomez. 1979. Effect of different agars on the recovery of heated *Escherichia coli* K-12. *J. Appl. Bacteriol.* 46:331-334.
- Pettijohn, D.E. 1976. Prokaryotic DNA in nucleoid structure. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 4:175-202.
- Pettijohn, D., R.M. Hecht, D. Stimpson and S. van Scoyk. 1978. An explanation for rotor speed effects observed during sedimentation of large folded DNA molecules. *J. Mol. Biol.* 119:353-359.
- Pettijohn, D.E., R.M. Hecht, O.G. Stonington and T.D. Stamato. 1973. Factors stabilizing DNA folding in bacterial chromosomes. IN: R.D. Wells and R.B. Inman (editors), *DNA Synthesis In Vitro*, pp. 145-162. Baltimore: University Park Press.
- Pierson, M.D., R.F. Gomez and S.E. Martin. 1978. The involvement of nucleic acids in bacterial injury. *Adv. Appl. Microbiol.* 23:263-285.
- Pierson, M.D., R.I. Tomlins and Z.J. Ordal. 1971. *J. Bacteriol.* 105:1234-1236.
- Portalier, R. and A. Worcel. 1976. Association of the folded chromosome with the cell envelope of *Escherichia coli*: Characterization of the proteins at the DNA-membrane attachment site. *Cell.* 8:245-255.
- Ray, B. and M.L. Speck. 1972. Metabolic process during repair of freeze-injury in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol.* 24:585-590.
- Richardson, J. 1975. Attachment of nascent RNA molecules to superhelical DNA. *J. Mol. Biol.* 98:565-579.
- Robertson, H.D., R.E. Webster and N.D. Zinder. 1968. Purification and properties of Ribonuclease III from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 243:82-91.
- Rouviere-Yaniv, J. and F. Gros. 1975. Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-binding protein from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:3428-3432.
- Rubenstein, I. and S.B. Leighton. 1971. The influence of rotor speed on the sedimentation behavior of sucrose gradients of high molecular weight DNA's. *Biophys. Soc. Abstr.* 11:209a.

